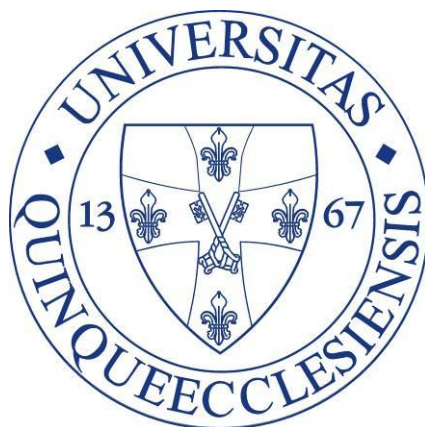


MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A PACAP NEUROPROTEKTÍV ÉS ÁLTALÁNOS
CITOPROTEKTÍV HATÁSAINAK VIZSGÁLATA IN
VITRO ÉS IN VIVO MODELLEKBEN**

Reglődi Dóra



**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ANATÓMIAI INTÉZET
PÉCS, 2009**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
I. BEVEZETÉS	5
I.1. Hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)	5
I.2. A PACAP előfordulása a szervezetben	6
I.3. A PACAP-receptorok és előfordulásuk a szervezetben	6
I.4. A PACAP élettani hatásai	7
I.5. A PACAP neurotrophicus és neuroprotektív hatásai	9
I.6. A PACAP sejttúlélést serkentő hatásai nem neuronális sejtekben	11
I.7. Kísérleti előzmények: a PACAP neuroprotektív hatása <i>in vivo</i> kísérletekben	11
I.8. Az értekezés alapját képező modellek bemutatása és a célkitűzések megalapozása	13
I.9. Célkitűzések összefoglalása	19
II. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21
II.1. Stroke modellen végzett kísérletek	21
II.2. Neurodegeneratív betegségek állatkísérletes modelljén végzett kísérletek	26
II.3. A PACAP retinoprotektív hatásainak vizsgálata	29
II.4. A korai idegrendszeri fejlődés funkcionális vizsgálata pozitív és negatív hatású környezetben	31
II.5. A PACAP neuroprotektív hatásmechanizmusának vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i>	39
II.6. A PACAP nem neuronális protektív hatásának vizsgálata <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i>	40
II.7. Statisztikai analízis	43
III. EREDMÉNYEK	45
III.1. Stroke modellen végzett kísérletek eredményei	45
III.2. Neurodegeneratív betegségek állatkísérletes modelljén végzett kísérletek	49
III.3. PACAP retinoprotektív hatásainak vizsgálata	64
III.4. A perinatális idegrendszeri fejlődés vizsgálata PACAP, PACAP antagonistá, MSG és hypoxia/ischaemia hatására patkányban	73
III.5. A PACAP neuroprotektív hatásmechanizmusának vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i>	86
III.6. A PACAP nem neuronális hatásainak vizsgálata <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i>	91
IV. MEGBESZÉLÉS	102
V. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	135
VI. IRODALOMJEGYZÉK	139
VII. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	158
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	158
Egyéb közlemények	160
Köszönetnyilvánítás	163

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIF: apoptózis indukáló faktor
BCCAO: kétoldali a. carotis communis okklúzió (bilateral common carotid artery occlusion)
BDNF: agyi eredetű neurotrophicus faktor (brain-derived neurotrophic factor)
CREB: cAMP reszponzív elem-kötő protein (cAMP responsive element binding protein)
DMEM: Dulbecco Modified Eagle medium
DRG: hátsó gyöki ganglion (dorsal root ganglion)
E: embrionális nap (E4, E14 stb)
EGF: epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
ERK: extracelluláris-szignál regulálta kináz
FGF: fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)
FITC: fluoreszcein izothiociánát
GABA: gamma-amino-vajsav (gamma-amino-butyric acid)
GDNF: gliális eredetű neurotrophicus faktor (glial cell line-derived neurotrophic factor)
GFAP: gliális fibrilláris savas protein (glial fibrillary acidic protein)
icv: intracerebroventricularis
IGF: inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
IL: interleukin
ILM: belső határmembrán (inner limiting membrane)
INL: belső magvas réteg (inner nuclear layer)
ip: intraperitoneális
IPL: belső rostos réteg (inner plexiform layer)
iv: intravénás
JNK: c-jun N-terminális kináz
KO: knockout
LIF: leukémia gátló faktor (leukemia inhibiting factor)
LPS: lipopoliszaharid
MAPK: mitogén aktiválta protein kináz
MCAO: a. cerebri media okklúzió (middle cerebral artery occlusion)
MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MSG: nátrium glutamát (monosodium glutamate)
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium bromid
NGF: idegsejt növekedési faktor (nerve growth factor)
NMDA: N-metil-D-aszparaginsav
6-OHDA: 6-hidroxidopamin
OLM: külső határmembrán (outer limiting membrane)
OLM-ILM: külső határmembrán és a belső határmembrán közötti távolság (outer limiting membrane-inner limiting membrane)
ONL: külső magvas réteg (outer nuclear layer)
OPL: külső rostos réteg (outer plexiform layer)
OVX: ovariectomizált
PACAP: hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (pituitary anenylate cyclase activating polypeptide)
PAC1R: PACAP 1. típusú receptor

PKA: protein kináz A
PKC: protein kináz C
PLC: foszfolipáz C
sc: szubkután
shh- sonic hedgehog
TdT: terminális deoxinukleotid transzferáz
TGF-1beta: transforming growth factor 1 beta
TH: tirozin hidroxiláz
TTC: 2,3,5-trifeniltetrazólium klorid
VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
VGAT 1: vezikuláris GABA transzporter 1
VGLUT 1: vezikuláris glutamát transzporter 1
VIP: vazóaktív intesztinális peptid

I. BEVEZETÉS

Jelen értekezésben az utóbbi 10 év munkájából született eredmények kerülnek bemutatásra, melyek túlnyomórészt a PACAP neurotrophicus és neuroprotektív hatását írják le *in vitro* és *in vivo* körülmények között. A bevezetésben a PACAP általános tulajdonságairól és hatásairól adok áttekintést, valamint bemutatom az értekezés célkitűzéseit. Elsődleges célunk a PACAP hatásának vizsgálata volt, olyan állatkísérletekben, melyek nagy humán populációt érintő megbetegedéseket modelleznek: stroke, neurodegeneratív betegségek, retinális degeneráció, újszülöttkori idegrendszeri károsodások. Mindezek mellett a PACAP általános citoprotektív hatását és a molekuláris hatásmechanizmust is vizsgáltuk neuronális és nem-neuronális sejtekben.

I.1. A hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A 38 aminosavból álló neuropeptidet, a hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptidet (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide=PACAP) 1989-ben izolálták először birka hypothalamusból, a hypophysisben kifejtett adenilát cikláz aktiváló hatása révén (Miyata et al., 1989). Egy évvel később egy, a szervezetben aktív, rövidebb fragmensét is azonosították, a 27 aminosavból álló PACAP27-et (Miyata et al., 1990). Az emlős szervezetben előforduló PACAP közel 90%-át a PACAP38 teszi ki, PACAP27 csak kisebb mennyiségben van jelen (Arimura et al., 1991). Az ennél rövidebb fragmensek általában antagonistá hatással rendelkeznek, ezek közül a legáltalánosabban alkalmazott antagonistá a PACAP6-38 (Bourgault et al., 2008b). A PACAP felfedezésének története a hormont izoláló és a PACAP kutatásban a későbbiekben is élen járó munkacsoport közelmúltban elhunyt vezetője, Akira Arimura Professzor által, illetve emlékére írt közleményekben olvasható (Arimura, 2007; Shioda et al., 2008). A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intesztinális peptid (VIP) peptidcsaládba tartozik (Arimura, 1998; Mustafa és Eiden, 2006), szekvenciája minden emlősben azonos, és egyéb gerincesekben is csak 1-4 aminosav eltérés mutatható ki (Vincze és Köves, 2001; Vaudry et al., 2000a). Ez azt bizonyítja, hogy a filogenetikai fejlődés során szinte változatlanul konzerválódott molekula alapvető élettani funkcióval rendelkezik. A PACAP felfedezése

óta eltelt közel két évtizedben a peptid „túlnőtt” a nevét, hiszen a szervezetben gyakorlatilag mindenhol előfordul és számos élettani hatással rendelkezik.

I.2. A PACAP előfordulása a szervezetben

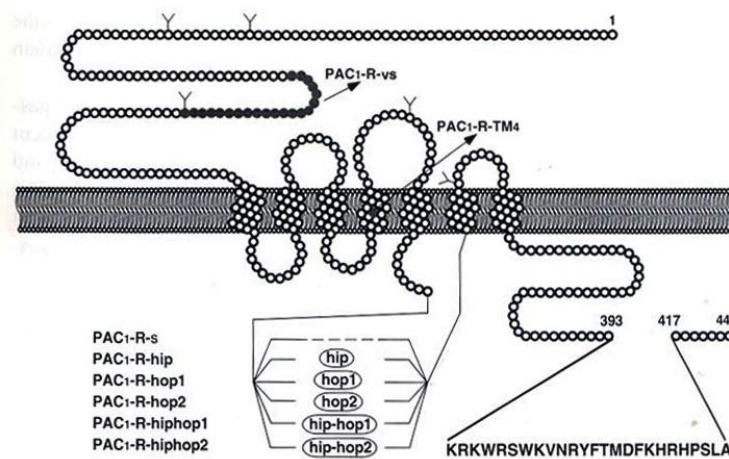
A PACAP legnagyobb mennyiségben a központi és perifériás idegrendszerben fordul elő, de kimutatható más szövetekben is, többek között az endokrin mirigyekben, ivarszervekben, a cardiovascularis rendszerben és a gastrointestinalis traktus teljes hosszában. A PACAP a központi idegrendszerben legnagyobb mennyiségben a hypothalamusban mutatható ki, de a kéregállományban, a középagyban, az agytörzsben, a bazális ganglionokban, a thalamusban, a hypophysisben és a cerebellumban is találhatók PACAP tartalmú sejtek. A perifériás idegrendszerben a spinalis ganglionok kis érzőidegsejtjei, illetve a vegetatív prae- és postganglionaris neuronok tartalmazzak PACAP-ot (Arimura, 1998; Köves et al., 1990; Vaudry et al., 2000a).

A nem idegi struktúrákat tekintve a PACAP jelentős koncentrációban mutatható ki a herében, a mellékvese chromaffin-sejtjeiben és a pancreas Langerhans-szigeteinek sejtjeiben. A PACAP-ot közel az összes szervben (szív, tüdő, máj, vese, nyirokszervek) detektálták már, bár a bennük található PACAP valószínűleg nagyrészt, de nem kizárólag idegi és endokrin eredetű (Arimura et al., 1991; Kántor et al., 2002; Köves et al., 1993). A PACAP idegrendszeri és perifériás előfordulásának feltérképezésében magyar kutatóknak jelentős szerepük volt, elsősorban Köves Katalin és munkatársai; Kozicz Tamás, Légrádi Gábor, Palkovits Miklós, Somogyvári-Vigh Anikó és Vigh Sándor munkáinak van alapvető jelentősége (Arimura et al., 1991; Das et al., 2007; Kántor et al., 2002; Kausz et al., 1998, 1999; Kozicz és Arimura, 2000, 2002; Kozicz et al., 1997, 1998a,b; Köves et al., 1990, 1991, 1993, 1998a, 2000; Légrádi et al., 1994, 1998; Palkovits et al., 1995; Shioda et al., 1994, 1997; Vereczki et al., 2006; Vigh et al., 1991; Vincze et al., 1999, 2001; Yanaihara et al., 1998).

I.3. A PACAP-receptorok és előfordulásuk a szervezetben

A PACAP hatását a szervezetben specifikus G-protein receptorok közvetítik. A receptor, mely a VIP receptor családba tartozik, hét transzmembrán kart és egy intracellulárisan G-proteint kötő domént tartalmaz. A humán PAC1 receptort kódoló gén a 7. kromoszómán

található. A PAC1 receptor két-három nagyságrenddel nagyobb affinitást mutat a PACAP-hoz, mint a VIP-hez, míg a VPAC1 és VPAC2 receptorok a PACAP-ot és a VIP-et egyforma erősséggel kötik (Arimura 1998; Laburthe et al., 2007). A PACAP receptorok eloszlása függ a receptor típusától: PAC1 receptor mutatható ki többek között az agyban, a gerincvelőben, az adenohypophysisben, a mellékvesevelőben és a herében. VPAC1-receptor található a központi idegrendszer mellett a tüdőben, a májban, a lépben, a thymusban, az ováriumban és a gastrointestinalis traktusban (Hashimoto et al., 1996; Joo et al., 2004). A PAC1 receptor 8 splice variánsa ismert (**I.1. ábra**). A 3. intracelluláris karon található „hip” és „hop” szekvenciákat tartalmazó variánsokat PAC1R-hip, hop1, hop2, hip-hop1, hip-hop2, míg az ezt nem tartalmazó variánst short variánsnak nevezték el (Arimura, 1998). A „very short” variáns esetében az N-terminális végen hiányzik az extracelluláris domén, míg a PAC1R TM4 variáns esetében a 2. és 4. transzmembrán domén különbözik (Arimura, 1998; Dickson és Finlayson, 2009; Vaudry et al., 2000a).



I.1. ábra. A PAC1 receptor 8 variánsának szerkezete (Arimura, 1998)

I.4. A PACAP élettani hatásai

A PACAP - a későbbiekben részletesebben tárgyalandó citoprotektív hatásain kívül - számos élettani hatással rendelkezik a szervezetben. Ezekről több összefoglaló tanulmány is megjelent (Arimura, 1998; Counis et al., 2007; Ganea és Delgado, 2002; Mustafa és Eiden, 2006; Sherwood et al., 2000, 2007; Vaudry et al., 2000a). A PACAP hatásainak vizsgálatában is jelentős szerepet játszottak magyar kutatók (Adamik és Telegdy, 2004, 2005; Agarwal et al., 2005; Barthó et al., 2000; Csaba et al., 1997; Heinzlmann et al.,

2008; Kis et al., 1999; Lázár et al., 2001; Légrádi et al., 2007; Lénárd et al., 2000; Lenti et al., 2007; Li et al., 2005; Mácsai et al., 2002; Norrholm et al., 2005; Pataki et al., 2000, 2002, 2003; Rékási és Czömpöly, 2002; Szabó et al., 1998, 2002, 2004; Telegdy és Kokavszki, 2000). Miután a hypothalamusból izolálták, először a centrális endokrin hatásai váltak ismertté (Counis et al., 2007; Köves et al., 1990, 1998a). A PACAP részt vesz a hypophysis hormontermelésének szabályozásában, az elülső és a hátsólebeny hormonokéban egyaránt (Chiodera et al., 1995; Evans, 1999, Kántor et al., 2000; Okada et al., 2007; Rawlings és Hezareh, 1996; Vaudry et al., 2006). A hypophysisben is termelődik, és a mirigyben kifejtett szerepének köszönhetően ma már magyar egyetemi szövevényben is szerepel a PACAP, mint hypophysis neurohormon (Röhlich, 2002, 2006). Számos egyéb endokrin hatása is ismert (Vaudry et al., 2006): befolyásolja a pajzsmirigyműködést (Okada et al., 2007), a gonádok steroid termelését (El-Gehani et al., 2000), a spermiogenezist és az ovariális follicularis fejlődést (Apa et al., 2002; Barberi et al., 2007; Csaba et al., 1997; Gras et al., 2005; Li et al., 2004), stimulálja a mellékvese katekolamin szintézisét (Isobe et al., 2003), valamint a pancreas inzulintermelését (Winzell and Ahren, 2007).

A PACAP központi szerepet játszik a napi ritmus szabályozásában is (Hannibal, 2006; Hannibal és Fahrenkrug, 2004; Köves et al., 2003; Nagy és Csernus, 2007; Vereczki et al., 2006). A PACAP a glutamát mellett a retinohypothalamicus pálya fő transzmittere, és számos folyamatot befolyásol a nucleus suprachiasmaticusban és a corpus pinealéban (Hannibal, 2006; Rékási és Czömpöly, 2002). A corpus pineale melatonin termelésére kifejtett hatását munkacsoportunk is vizsgálta, ezen eredmények nem képezik az értekezés részét. Kimutattuk, hogy a PACAP fokozza a melatonin termelést a tobozmirigyben, mely már korai embrionális korban is megfigelhető, azonban a melatonin cirkadián ritmusát nem befolyásolja (Csernus et al., 2004; Faluhelyi et al., 2004, 2005; a saját közleményekre való hivatkozások jegyzéke a VII. fejezetben található).

Emellett a PACAP-ról kimutatták, hogy részt vesz az alvásszabályozásban (Murck et al., 2007), a centrális sympatheticus neuronális aktivitás szabályozásában (Farnham et al., 2008), a hőszabályozásban (Pataki et al., 2002) és befolyásolja a kemorecepciót a glomus caroticumban (Xu et al., 2008). A PACAP serkenti a

memória-folyamatokat, amit a PACAP és a PACAP receptor KO egerek memóriazavara is mutat (Matsuyama et al., 2003; Otto et al., 2001; Roberto és Brunelli, 2000). A PACAP számos viselkedésre gyakorolt hatását is leírták. Befolyásolja többek között a steroid-indukálta reprodukciós viselkedést patkányban és egérben (Apostolakis et al., 2004), növeli a lokomotoros aktivitást patkányban és egérben (Adamik és Telegdy, 2004; Masuo et al., 1995), részt vesz a stressz adaptációs magatartás szabályozásában (Agarwal et al., 2005; Légrádi et al., 2007) és antidepresszáns hatásai is vannak (Reichenstein et al., 2008).

Egyéb perifériás hatásokkal is rendelkezik a peptid: befolyásolja a gastrointestinalis és légúti motilitást és szekréciót (Barthó et al., 2000; Foda et al., 1995; Köves et al., 1993; Lázár et al., 2001; Oh et al., 2005; Tornoe et al., 2001), az excitabilitást és a hormonszekréciót a szívben (Hardwick et al., 2006), a húgyúti szervekben hat a vizeletürítési reflexre és az érzőbeidegzésre (Braas et al., 2006; Fahrenkrug és Hannibal, 1998), valamint simaizom relaxáns hatása van az erekben (Lenti et al., 2007). Ezenkívül hat a fájdalomérzés központi és perifériás szabályozására. Az érzőidegvégződéseken felszabaduló szenzoros neuropeptid szekrécióra kifejtett hatását munkacsoportunk is vizsgálta, azonban ez nem képezi a dolgozat részét (Davis-Taber et al., 2008; Helyes et al., 2007; Németh et al., 2006; Sándor et al., 2008).

I.5. A PACAP neurotrophicus és neuroprotektív hatásai

Érdeklődésünk középpontjában a PACAP neurotrophicus és neuroprotektív hatásának vizsgálata állt, melyet a PACAP felfedezése óta számos kísérlet bizonyított. Ezek a megfigyelések zömmel *in vitro* kísérletekből származnak. Jelenleg több, mint 100 közlemény számol be a PACAP sejtvédő hatásairól. A PACAP neuronális protektív hatásait 2004-ben mi is összefoglaltuk egy review közleményben (Somogyvári-Vigh és Reglődi, 2004). A neuronális túlélést a jelátviteli utak komplex lánc befolyásolja, melyek egyensúlyát a sejtekre ható stressz megbontja. A stresszor hatása függ a neuron típusától, a stresszor fajtájától, a behatás erősségétől és idejétől, és számos, a sejtekre ható túlélési szignál jelenlététől (Kopper és Fésüs, 2002; Morrison et al., 2002; Szeberényi, 1999). Neuronális apoptózist számos behatás eredményezhet, többek között a neurotrophicus faktorok hiánya, a halálreceptorok stimulálása, a DNS károsodás és

különböző toxikus behatások. Általánosságban elmondható, hogy a különféle behatások több jelátviteli úton keresztül a kaszpáz család tagjait, elsősorban a kaszpáz-3-at stimulálják, mely végül a sejtek halálához vezet (Ádám, 2001; Morrison et al., 2002).

A PACAP neuronális túlélést elősegítő hatását először patkány pheochromocytomából származó PC12 sejtekben az idegi növekedési faktor megvonásakor (Tanaka et al., 1997), és cerebelláris szemcsesejtekben szérumentes tenyésztő médium alkalmazásakor írták le (Canonica et al., 1996). A későbbiekben tucatnyi közlemény számolt be a PACAP antiapoptotikus és sejttúlélést elősegítő hatásáról szemcsesejtekben (Vaudry et al., 1998), kolinerg neuronokban (Takei et al., 2000) és hátsó gyöki ganglionsejtekben (Lioudyno et al., 1998). A PACAP számos toxikus tényezővel szemben védi a neuronokat. Leírták védő hatását glutamát toxicitással szemben retina sejtekben (Shoge et al., 1999), kortikális neuronokban (Morio et al., 1996) és PC12 sejtekben (Said et al., 1998). Kisagyi szemcsesejtekben csökkenti a PACAP az ethanol, az oxidatív stressz és a ceramid-indukálta apoptózist (Vaudry et al., 2002b,c, 2003). Ezeken kívül a PACAP védő hatását leírták beta-amiloid protein, 6-hydroxydopamin (6-OHDA), HIV-burokfehérje, *in vitro* hypoxia és emelkedett Ca^{2+} szint okozta sejtkárosodással szemben is (Onoue et al., 2002a,b,c; Takei et al., 1998). A PACAP számos, részben egymással konvergáló jelátviteli úton keresztül fejti ki protektív hatásait. A citoprotektív hatásokért csaknem minden esetben a PAC1 receptor felelős. Ennek részletes tárgyalását összefoglaló közleményünkben írtuk le, és több, ezzel kapcsolatos más összefoglaló közlemény is rendelkezésre áll (Botia et al., 2007; Meyer, 2006; Somogyvári-Vigh és Reglődi, 2004). A PACAP a PAC1 receptorokon keresztül aktiválja az adenilát ciklázt és a foszfolipáz C-t, melynek hatására cAMP-függő, és attól független útvonalak aktiválódnak. A protein kináz A (PKA) aktiváció hatására általában a védő hatású MAPK (mitogén aktiválta protein kináz), és az ERK (extracelluláris szignál által regulált kináz) foszforiláció megemelkedik, a neuronpusztulást elősegítő JNK (c-jun N-terminális kináz) és p38 MAPK foszforiláció pedig gátlódik. A PKA célútvonalában a Rap1 és Ras aktiváción keresztül is aktiválja az ERK-t, valamint a CREB (cAMP reszponzív elem- kötő protein) foszforilációt. Az apoptózis mitokondriális útvonalát is befolyásolja: a Bcl család antiapoptotikus tagjait aktiválja (Bcl-2, Bcl-xL), míg

proapoptotikus tagjait inaktiválja (Bad, Bax). A PACAP erőteljesen gátolja a kaspáz-függő és független apoptotikus folyamatokat is.

A PACAP neuroprotektív hatásával szorosan összefügg az idegrendszer fejlődésében betöltött szerepe, mely további adatokat szolgáltat a neuroprotektív hatás megértéséhez. Ezzel kapcsolatban is számos összefoglaló közlemény született (Meyer, 2006; Waschek, 2002; Watanabe et al., 2007; Zhou et al., 2001). Azért nagyon fontos a PACAP fejlődésben betöltött szerepét ismerni, mert az idegrendszert ért károsító behatásokra az embrionális fejlődésben szerepet játszó mechanizmusok újra fokozottabban aktiválódnak (Waschek, 2002). A PACAP és receptorai igen korán megjelennek az idegrendszerben, és szerteágazó hatásokkal rendelkeznek a neurogenesisben, a neuronális differenciációban, a gliasejtek fejlődésében, valamint szerepük van az idegrendszeri mintázat kialakításában is (Waschek, 2002). A PACAP upregulációját többféle sérülést követően leírták, és endogén szerepe is ismert a PACAP KO egerek tanulmányozása, illetve a PACAP endogén antagonizálása révén (Somogyvári-Vigh és Reglődi, 2004; Waschek, 2002). A fent említett folyamatok részletes tárgyalására a megbeszélés fejezetben kerül sor, mivel munkánk középpontjában ezen hatások vizsgálata állt.

I.6. A PACAP sejttúlélést serkentő hatásai nem-neuronális sejtekben

Azt a kezdeti megfigyelést, miszerint a PACAP elsősorban az idegrendszerben fordul elő, és fejti ki hatásait, számos olyan megfigyelés követte, mely szerint a PACAP sejttúlélést elősegítő hatásai nem korlátozódnak az idegsejtekre. Hypophysis adenoma sejtekben a PACAP védő hatása a TGF-beta-indukálta apoptózissal szemben (Oka et al., 1999), csökkenti az apoptózist ovarium follicularis sejtekben (Lee et al., 1999) és prostata tumorsejtekben (Gutierrez-Canas et al., 2003). Ezenkívül csökkenti a T-sejtek fejlődés során tapasztalható apoptózist és glukokortikoid, valamint Fas-ligand kiváltotta sejthalálát (Delgado és Ganea, 2000a,b, 2001; Delgado et al., 1996).

I.7. Kísérleti előzmények: a PACAP neuroprotektív hatása *in vivo* kísérletekben

Munkánk megkezdése előtt mindössze néhány adat állt rendelkezésre arról, hogy a PACAP erőteljes sejttúlélést elősegítő hatása *in vivo* körülmények között is érvényesül.

Kimutatták, hogy patkány globális agyi ischaemiában, a peptid intravénás (iv) vagy intracerebroventricularis (icv) adása jelentősen csökkenti a hippocampus CA1 régiójában a sejtpusztulást akkor is, ha a PACAP adása 24 órával az ischaemia indukció után történik (Uchida et al., 1996). Ezenkívül ismert volt, hogy a peptid iv adása csökkenti a kolinerg sejtek pusztulását fornix átvágásakor, habár kisebb mértékben, mint az NGF adása (Takei et al., 2000). Ph.D. dolgozatom alapját a PACAP *in vivo* stroke modellben kifejtett hatásának vizsgálata képezte. Ezen kísérleteket a New Orleans-i Tulane Egyetemen végeztem, Akira Arimura professzor irányítása alatt. Először a modell standarizálását végeztük el. Igazoltuk, hogy a spontán fellépő hyperthermia elkerülhetetlen következménye a kísérletes arteria cerebri media okklúciónak. A spontán hyperthermia egyaránt fellépett 90 és 120 perces tranziens, illetve permanens okklúziókor. Az így kialakuló magas testhőmérséklet az első napon végig megfigyelhető volt, és jelentősen növelte az infarktus nagyságát. A spontán hyperthermia meggyorsította a penumbrális terület bevonódását az infarktusos területbe. Ez az okklúzió utáni első 4 órában volt a legkifejezettebb, amely jelentősen csökkentheti a terápiás beavatkozások sikerét (Reglődi et al., 2000a).

Kimutattuk, hogy a PACAP neuroprotektív tranziens fokális agyi ischaemiában, folyamatos szisztémás adagolás esetén. Kísérleteink azt mutatták, hogy a PACAP széles terápiás ablakkal rendelkezik, hiszen az okklúzió után 4 órával beadva is 50%-kal csökkentette a károsodott agyterület nagyságát (Reglődi et al., 2000b). Ezen neuroprotektív hatást nem befolyásolta enyhe postischaemiás hyperthermia (Reglődi et al., 2000c). Korábban már bizonyították, hogy a PACAP átjut a vér-agy gáton egérben (Banks et al., 1993), azonban az nem volt ismert, hogy ez hogyan változik ischaemiás körülmények között patkányban. Kimutattuk, hogy a PACAP átjut a vér-agy gáton patkányban is. Fokális ischaemiában 4 órával az okklúzió után fokozódik a PACAP bejutása az agyszövetbe, 6 és 24 órával az okklúzió után csökken, és 48 órával az okklúzió után visszatér a normál szintre. Ezen változások nem mutattak párhuzamot az albumin bejutásának változásával, tehát a fokális ischaemia szelektíven változtatta meg a PACAP átjutását a vér-agy gáton (Somogyvári-Vigh et al., 2000). Az értekezésben bemutatott munkák ezen kezdeti tanulmányok folytatását képezik. Munkánkkal

párhuzamosan, illetve azt követően számos kutatócsoport igazolta a PACAP *in vivo* neuroprotektív hatásait. Ezek részletes bemutatása a megbeszélés fejezetben található.

I.8. Az értekezés alapját képező modellek bemutatása és a célkitűzések megalapozása

I.8.1. Stroke modell

Az agyi vascularis katasztrófák és ezek komplikációi képezik az ipari országokban a harmadik leggyakoribb halálokat, és a legtöbb tartósan fennálló, ápolásra szoruló mozgáskorlátozottságot és szellemi hanyatlást (Lipton, 1999). Hazánkban évi 40 000 kórházi felvétel történik agyérbetegségek miatt, ezekből több mint 20 000 végződik halállal (Nagy, 1999). Az agyban a leggyakrabban kialakult károsodás ischaemiás vagy hypoxiás jellegű, ami elsősorban az idegsejtek pusztulásával jár. A stroke egyik leggyakoribb oka az arteria cerebri media vagy ágainak elzáródása embolizáció miatt (Nagy, 2006). Minden therápiás próbálkozás végső célja az idegsejt károsodás mértékének, az agyi lézió volumenének csökkentése, a kiesési tünetek súlyosságának mérséklése, a túlélés javítása (Nagy, 2006). A jelenleg rendelkezésre álló therápiás lehetőségek rendkívül korlátozottak. A gyógyszerkísérletek középpontjában álló szerek többsége a klinikai kipróbálásban egyelőre nem bizonyult hatékonynak részben a mellékhatások, részben a nagyon rövid therápiás ablak miatt (Beresford et al., 2003; Dyker és Lees, 1998).

Fokális ischaemia modellként a legáltalánosabban használt modellt, az arteria cerebri media intraluminális elzárását használtuk (Carmichael, 2005; Longa et al., 1989). Fontos, hogy a modellt standardizáljuk saját kísérletes körülményeink között, hiszen az irodalomból jól ismert, hogy az infarktus nagyságát számos tényező befolyásolja, többek között az állatfaj, a használt patkány törzs, az állatok kora, technikai részletek, a műtéti komplikációk és az anesztézia (Ábrahám et al., 2002; Belayev et al., 1996; Lipton, 1999; Marosi et al., 2006; Warner et al., 1991). A modell standardizálása során úgy találtuk, hogy kísérletes körülményeink között az agyi infarktusos terület nagysága az első 12 óra során lassan növekszik, majd 24 óra múlva eléri a maximális nagyságot. A stroke kialakulása után spontán fellépő hyperthermiát tapasztaltunk, mely gyorsítja a folyamatot, ezért a kísérletek során mindig kontrolláltuk a műtét alatti és utáni hőmérsékletet.

Korábbi kísérleteink alapján szisztémás, folyamatos infúzióban adott PACAP tranziens fokális ischaemiában neuroprotektív hatással rendelkezik. Jelen kísérletünkben célul tűztük ki a PACAP hatékonyságának vizsgálatát permanens ischaemiában, egyszeri bolus injekcióval. Összehasonlítottuk a PACAP hatékonyságát a PACAP-pal legközelebbi szerkezeti rokonságot mutató VIP-pel. A neuroprotektív stratégiák egyik fő jellemzője a morfológiai károsodás csökkentése mellett a funkcionális javulás. Számos magatartási jelet vizsgálnak stroke modellekben (Corbett és Nurse, 1998), ezek közül összeállítottunk egy tesztskálát és értékeltük ennek prediktív értékét. Majd annak vizsgálata volt a cél, hogy a PACAP javítja-e a fellépő funkcionális deficitet.

I.8.2. A PACAP neuroprotektív hatása neurodegeneratív betegségek modelljeiben

A Parkinson-kór egy krónikus neurodegeneratív betegség, melynek háttérében elsődlegesen a substantia nigra pars compacta dopaminerg neuronjainak pusztulása áll (Szirmai, 2007; Takáts, 2001; Tárchy és Takáts, 1994). A kór prevalenciája világszerte igen magas, elsősorban az idősebb korosztályban (Szirmai, 2007). A Parkinson-kór állatkísérletes modelljei közül az egyik leggyakrabban alkalmazott a substantia nigra 6-OHDA-nal való roncsolása, mely tipikus tünetegyütteshez vezet az állatokban. A léziót követően akut hypokinesia jelentkezik a humán Parkinson-kórhoz hasonlóan, melyet részleges javulás követhet a lézió nagyságától függően (Mokrey, 1995; Schwarting és Huston, 1996a,b). Féloldali roncsolás esetén nagyon jellemző a féloldali mozgástünetek kialakulása, mely ugyancsak spontán javulást mutathat (Schwarting és Huston, 1996a,b). Hasonlóan a humán Parkinson-kórhoz, patkányokban 70-80%-os sejtpusztulás esetén jelentkeznek csak krónikus tünetek, kisebb lézió esetén a tünetek gyors javulást mutatnak, vagy nem is jelentkeznek (Schwarting és Huston, 1996a,b). Korábbi *in vitro* tanulmányból ismert volt, hogy a PACAP a mesencephalicus dopaminerg sejteket védi 6-OHDA-nal szemben (Takei et al., 1998). Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a PACAP protektív hatása érvényesül-e *in vivo* Parkinson-kór modellben, melyhez az unilaterális 6-OHDA léziót választottuk. Komplex morfológiai és funkcionális értékeléssel vizsgáltuk a PACAP hatásait substantia nigra roncsoláskor. A neuroprotektív szerek kutatásának egyik hátránya, hogy a kísérletek túlnyomó többsége fiatal hím állatokon történik, pedig a Parkinson-kór jellegzetesen időskori betegség, és nőkben is

gyakran előfordul (Szirmai, 2007). Ezért vizsgálatainkat kiterjesztettük idős, nőstény és gonadektomizált állatokra.

Miután igazoltuk, hogy a PACAP neuroprotektív patkány Parkinson-kór modellben, egy másik neurodegeneratív megbetegedés, a striatum degenerációjával járó Huntington-chorea patkánymodelljében is vizsgáltuk a PACAP hatásait. Ehhez az unilaterális quinolinsav okozta striatalis léziót alkalmaztuk, mely a leginkább modellezi az emberi Huntington-chorea pathomorfológiai sajátosságait (Beal et al., 1986; Roberts et al., 1993). Ebben a modellben is vizsgáltuk a PACAP hatásait a morfológiai és funkcionális javulásra.

I.8.3. A PACAP retinoprotektív szerepének vizsgálata

A PACAP-ot és receptorait már korábban kimutatták a retinában (Seki et al., 2000a,b), és egy előzetes tanulmány beszámolt arról, hogy a PACAP *in vitro* retinakultúrában védelmet nyújt glutamát toxicitással szemben (Shoge et al., 1999). *In vivo* protektív hatását mindössze egy konferencia beszámoló ismertette, mely szerint ezen hatás érvényesül nervus opticus átvágása esetén is (Seki et al., 2003). Ezért célunk az volt, hogy kimutassuk, hogy a PACAP *in vivo* retinoprotektív hatásokkal is rendelkezik. Elsőként a nátrium glutamát (monosodium glutamate=MSG) toxicitás modellt alkalmaztuk, mely újszülöttkorban közzismerten a retina belső rétegeinek degenerációjához vezet, egyéb hatásai mellett (Seress et al., 1984; van Rijn et al., 1986). Ebben a modellben standard retinadegenerációt tudtunk létrehozni, és a PACAP kezelés dózisfüggését, lokális versus szisztémás és egyszeri versus többszöri kezelés hatékonyságát, a PACAP fragmensek hatását és a specifikus immunhisztokémiai markerekkel azonosított egyes retinális sejtekre kifejtett hatását vizsgáltuk. A glutamát toxicitása humán szemészeti betegségekben is előfordul, hiszen a glutamát excitotoxikus hatása részt vesz a neuronokat pusztító folyamatokban olyan betegségekben, mint glaukóma, ischaemia és trauma (Sucher et al., 1997; Vidal-Sanz et al., 2000). Miután igazoltuk, hogy a PACAP neuroprotektív cerebrális ischaemiában, arra voltunk kíváncsiak, retinális ischaemiában is érvényesül-e ez a hatás. Ehhez a bilaterális arteria carotis communis okklúziós modellt választottuk, mely agyi hypoperfúziót okoz, és ezzel

a retinában is károsodást idéz elő (Farkas et al., 2007; Marosi et al., 2006; Osborne et al., 2004; Yamamoto et al., 2006).

Tekintettel arra, hogy a PACAP szerkezete a gerincesek törzsén belül csupán 1-4 aminosavban tér el, valamint, hogy előfordulását és hatásait már korábban emlősöknél alacsonyabbrendű gerincerekekben is vizsgálták (Ciarlo et al., 2007), célul tűztük ki a rendkívüli anoxia tűrőképességgel rendelkező teknős idegrendszerben a PACAP kimutatását. Miután kimutattuk, hogy a PACAP igen magas koncentrációban fordul elő, elektrofiziológiai módszerekkel azt vizsgáltuk, vajon a retina anoxia tűrőképességében is szerepet játszhat-e. Ezen kísérleteinket egy olyan munkacsoporttal együtt végeztük, mely nagy rutinnal rendelkezik a retina morfológiai és funkcionális vizsgálatában (Gábel és Witkovsky, 1998; Rábl et al., 2002; Vigh et al., 2000).

I.8.4. A PACAP neurotrophicus hatásainak vizsgálata *in vivo*

A perinatális időszak alapvető fontosságú az idegrendszer fejlődésében. Az ebben az időszakban bekövetkező károsító hatások súlyos következményekkel járhatnak, melyek a felnőtt élet minőségét is befolyásolhatják (Ertl, 1999; Katona, 2001). A hypoxiás/ischaemiás és különféle toxikus léziók hosszútávú hatásai számos vonatkozásban jól ismertek rágcsálókban is (Archer és Frederiksson, 2007; Berger és Garnier, 1999; Eriksson et al., 2001; Palomo et al., 2003; Smart and Dobbing, 1971a,b). Azonban a korai, közvetlenül a posztnatális időszakot érintő változásokról keveset tudunk annak ellenére, hogy az irodalomban már felhívták a figyelmet a korai elváltozások prognosztikai jelentőségére (Ten et al., 2003).

Ismertek az idegrendszer fejlődését károsan befolyásoló tényezők, mint az alultápláltság, a posztnatális stressz, a hypoxia/ischaemia és a toxikus léziók, valamint az idegrendszer fejlődését elősegítő körülmények, mint trophicus faktorok és az ingergazdag környezet. Az idegrendszernek - főleg újszülöttkorban - nagyfokú plaszticitása és regenerációs képessége van, mely lehetővé teszi a károsodások következményeinek részleges kivédését. Patkányokban a születés utáni első két hét kritikus fejlődési periódusa az idegrendszernek, mely embernél az utolsó intrauterin hónapok történéseinek felel meg. Az újszülött patkány az emberhez képest sokkal fejletlenebb, szeme és külső hallójárata zárva van. Ezek kinyílása a metszőfog áttörés napjával együtt meghatározott

időpontban történik. A normál fejlődés során a patkányok motoros képességei folyamatosan fejlődnek. A különböző poszturális és komplex lokomotoros reflexek fokozatosan jelennek meg, végül a harmadik posztnatális hét végére érik el a felnőttkorra jellemző fejlettségi szintet. A normális fejlődési mintázat szerint a mellső végtag mindig megelőzi fejlettségben a hátsót, és a reflexteljesítmények javulása is meghatározott mintázatot követ (Altman és Sudarshan, 1975). Ugyanakkor a bonyolultabb motoros koordináció fejlődése néhány héttel tovább tart az elemi reflexekénél. Az ezen összetettebb motoros képességekkel párhuzamosan fejlődő újdonságkereső, ún. „novelty-seeking” magatartás vizsgálatára a legérzékenyebb a korai adolescens periódus (Stansfield et al., 2004).

Tekintve, hogy a PACAP-nak számos *in vitro* neurotrophicus hatása van, azonban ezt *in vivo* mindössze néhány esetben igazolták (Arimura et al., 1994; Vaudry et al., 1999), célunk volt annak vizsgálata, hogy a neonatális PACAP és PACAP antagonisták (PACAP6-38) kezelések hogyan befolyásolják a normális fejlődési mintázatot patkányban. Miután kimutattuk, hogy a PACAP gyorsítja az idegrendszeri fejlődést, az antagonisták pedig enyhén gátolja, a következő lépésben annak vizsgálata volt a cél, vajon különböző perinatális károsító hatásokat képes-e a PACAP enyhíteni. Ehhez először a modellek részletes leírását és standardizálását végeztük el. Toxikus lézióként a fent említett MSG kezelést alkalmaztuk, hypoxia/ischaemiás károsodás modellezéséhez pedig a féloldali carotis lekötést követő hypoxiás expozíciót. A modellekben részletesen vizsgáltuk a reflex- és motoros koordináció fejlődését, a felfedező és motoros aktivitás mértékét új környezetben az ún. „open-field” teszt segítségével, valamint az MSG lézió esetében az újdonságkereső magatartást. Miután kimutattuk, hogy mindkét kezelés jelentősen késlelteti a neuronális fejlődést, a PACAP esetleges védő hatásának vizsgálata volt a cél. Csirkeembriókon a PACAP antagonisták hatását vizsgáltuk az anyai hatás kiküszöbölése és az egyszerűbb *in ovo* kezelés miatt. Ebben a modellben is részletesen vizsgáltuk a lokomotoros aktivitást és a szociális viselkedést a kikelés után.

I.8.5. A PACAP neuroprotektív hatásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusok vizsgálata

A PACAP fent említett, erőteljes antiapoptotikus hatását csaknem kizárólag *in vitro* kísérletekből ismerjük, amit PC12 sejtekben mi is vizsgáltuk. Vizsgálataink elsődleges célja azonban annak igazolása volt, hogy vajon ezen hatások *in vivo* is érvényesülnek-e. Először stroke modellben vizsgáltuk az apoptózis mértékének változását PACAP hatására, majd a jól standardizált, MSG-indukálta neonatális retinadegenerációban. Részben az ismert jelátviteli utakat tanulmányoztuk (PKA, MAP kinázok, Bcl család fehérjéi, mitokondriális fehérjék transzlokációja, kaszpáz aktivitás), ezenkívül a PACAP eddig nem ismert jelátviteli hatásait is feltérképeztük (PKA/Bad/14-3-3 fehérje útvonal).

I.8.6. A PACAP nem-neuronális sejteken/szöveteken kifejtett védő hatásának vizsgálata

Mint fent említésre került, a PACAP hatásai nem korlátozódnak neuronális sejtekre. Céljaink között szerepelt a PACAP esetleges citoprotektív hatásának vizsgálata különböző károsító hatásoknak kitett nem-neuronális sejtekre. Vizsgáltuk a PACAP vese ischaemiában kifejtett hatását *in vivo*, és szívizom-, trophoblast-, és endothelsejtek *in vitro* túlélésében játszott szerepét, melyekben a PACAP ilyen jellegű hatásai korábban nem voltak ismertek. Ezen sejtekben is tanulmányoztuk a jelátviteli útvonalakat is, elsősorban az előző fejezetben említett fehérjék vizsgálatával.

Korábbi munkáinkból, melyekben a PACAP és a PAC1 receptor alacsonyabbrendű szervezetekben való előfordulását vizsgáltuk, nyilvánvaló volt, hogy a filogenetikailag igen konzervált szerkezetű PACAP (illetve PACAP-szerű peptid) előfordul, és biológiai aktivitással rendelkezik gerinctelen szervezetben is (Hernádi et al., 2008; Molnár et al., 2006, 2008; Reglődi et al., 2000; Somogyi et al., 2009; Somogyvári-Vigh et al., 2000). Ezen munkák megalapozták annak vizsgálatát, hogy vajon a PACAP egyik legtöbbet vizsgált hatása, az antiapoptotikus hatás, gerinctelen szervezetben is érvényesül-e. Ehhez éti csiga (*Helix pomatia*) nyálmirigyét használtuk, melyben az apoptotikus folyamatokat kollaborációs partnereink korábban részletesen feltérképezték (Pirger et al., 2009).

I.9. Célkitűzések összefoglalása

1. Vizsgálni kívántuk az egyszeri centrális PACAP kezelés hatását arteria cerebri media elzárással létrehozott patkány stroke modellben. Célunk volt továbbá egy részletes funkcionális tesztskála összeállítása és stroke modellben való alkalmazhatóságának vizsgálata. Vizsgálni kívántuk továbbá a PACAP hatását a funkcionális károsodásra és a cerebrális véraramlásra. Végül összehasonlítottuk a PACAP hatását a vele legközelebbi szerkezeti rokonságot mutató VIP hatásával.

2. Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a PACAP rendelkezik-e neuroprotektív hatással neurodegeneratív betegségek állatmodelljeiben. Először unilaterális substantia nigra roncsolással előidézett Parkinson-kór modellben vizsgáltuk a morfológiai és funkcionális károsodás kor- és nemfüggését, majd a PACAP hatásait és annak kor- és nemfüggését. A striatum unilaterális léziójával előidézett Huntington-chorea modellben is hasonló módon, részletes morfológiai és funkcionális vizsgálattal kívántuk ellenőrizni a PACAP hatékonyságát.

3. Kísérleti célkitűzéseink között szerepelt a PACAP retinoprotektív hatásainak tanulmányozása, MSG-indukálta toxikus és bilaterális carotis lekötéssel kiváltott ischaemiás retinakárosodásban patkányban. Vizsgáltuk a PACAP hatását specifikus immunhisztokémiai markerekkel azonosított retinális sejtekre, valamint összehasonlítottuk a PACAP fragmensek hatását retinális degenerációban. Az anoxiát rendkívül jól tűrő teknősben megmértük a PACAP koncentrációját a központi idegrendszerben, és elektrofiziológiai módszerekkel tanulmányoztuk retinális védőhatását.

4. Célul tűztük ki a PACAP és PACAP-antagonista hatásának vizsgálatát a korai idegrendszeri fejlődésre újszülött patkányban. Részletesen kívántuk tanulmányozni a reflexfejlődést és motoros koordináció fejlődését korai károsító behatás után (excitotoxicitás és hypoxia). Célul tűztük ki annak vizsgálatát, vajon a PACAP képes-e csökkenteni a glutamát-okozta fejlődésbeli késést. Csirkékben is ellenőriztük az *in ovo*

PACAP-antagonista kezelés hatását a motoros aktivitás és viselkedésfejlődésére a kikelés után.

5. Célul tűztük ki a PACAP *in vitro* és *in vivo* neuroprotektív hatásmechanizmusának tanulmányozását molekuláris biológiai módszerekkel. *In vivo* kísérletekben, stroke modellben vizsgáltuk az apoptózis mértékét, valamint retinadegeneráció során az apoptotikus jelátviteli utakat. PC12 sejteken pedig *in vitro* vizsgáltuk a PACAP antiapoptotikus hatását.

6. Vizsgálni kívántuk a PACAP citoprotektív tulajdonságait nem-neuronális sejtekben. Vese ischaemia/reperfúzió károsodásban vizsgáltuk a PACAP hatását *in vivo*. *In vitro* tanulmányoztuk a PACAP sejttúlélésre és jelátviteli utakra kifejtett hatását oxidatív stresszel károsított trophoblast-, endothel- és szívizomsejteken, és ischaemia/reperfúziónak kitett szívizomsejteken. Végül célul tűztük ki annak vizsgálatát, vajon a PACAP antiapoptotikus hatása érvényesül-e alacsonyabbrendű szervezetben is, ehhez a *Helix pomatia* nyálmirigyben kiváltott apoptózis modellt használtuk.

II. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

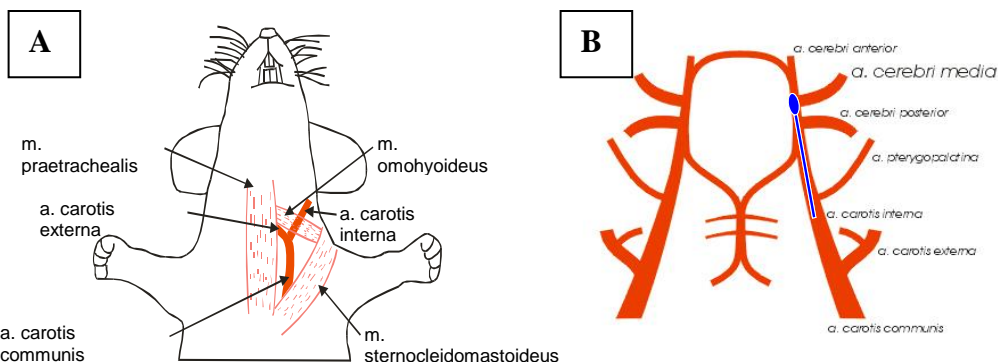
Használt állatok

In vivo kísérleteink többségéhez Wistar patkányokat használtunk. Az állatok elhelyezése, gondozása és felhasználása a Pécsi Tudományegyetem ellenőrzött protokollja (No: BA02/2000-31/2001, majd BA02/2000-20/2006) szerint történt. Az állatokat 12 órás világos-sötét ciklusban tartottuk, állandó táplálék- és folyadékellátás mellett. A csirke embrionális kísérletekhez megtermékenyített broiler csirke tojásokat a Mohácsi Keltetőből szereztünk be. Az állatok altatása intraperitoneális (ip) pentobarbitállal (35 mg/kg) vagy gázzal (halothan, isofluran) történt. A legtöbb esetben a PACAP kezelésekhez PACAP38-at használtunk, ezért a következőkben a PACAP elnevezés alatt a PACAP38 értendő. A kísérletekben felhasznált anyagok beszerzési forrása az értekezésben nem kerül külön említésre, az értekezéshez felhasznált közleményekben megtalálható.

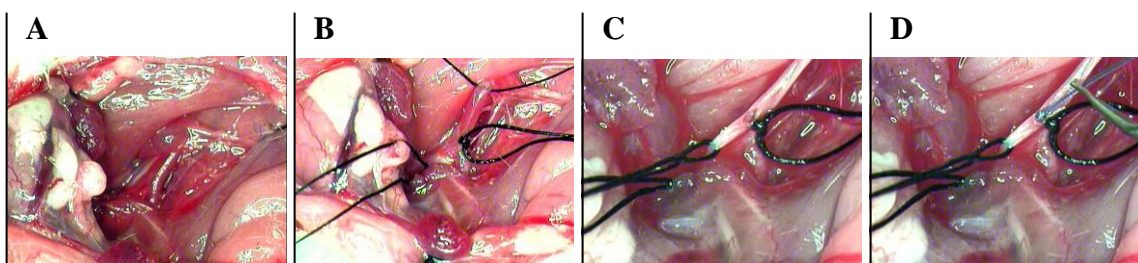
II.1. STROKE MODELLEN VÉGZETT KÍSÉRLETEK

II.1.1. Arteria cerebri media okklúziója (MCAO)

A stroke széles körben alkalmazott patkánymodellje az arteria cerebri media okklúziója (middle cerebral artery occlusion=MCAO) (Lipton, 1999; Longa et al., 1989). 5cm hosszúságú 4-0-ás nylon monofilamentum végére egy 0,5mm átmérőjű megvastagodást égettünk. Fiatal hím patkányokon (250-300g) féloldali nyaki feltárásból operációs mikroszkóp alatt lekötöttük az a. carotis communist, az a. carotis externát és az a. pterygopalatinát, majd az a. carotis communis oszlásánál egy metszést ejtve a filamentumot 19mm-re helyeztük fel, és ezzel egyidőben az a. carotis internát elkötöttük (**II.1. és 2. ábrák**). A műtét alatt melegített padon tartottuk az állatokat, közben és utána a rektális hőmérsékletet folyamatosan ellenőriztük. Amint a hőmérséklet emelkedni kezdett, az állatokat hűtöttük a hyperthermia elkerülése érdekében.



II.1. ábra. A műtési hely, patkány trigonum caroticum sematikus ábrázolása (A) és a filamentum helye az a. cerebri mediában (B).



II.2. ábra. Az MCAO műtési lépései, operációs mikroszkópos felvételek. (A) Az a. carotis communis oszlása; (B) Az a. carotis communis, a. carotis externa és a. pterygopalatina lekötése; (C) Metszés a carotis oszlásnál; (D) Filamentum felhelyezése.

II.1.2. PACAP kezelés

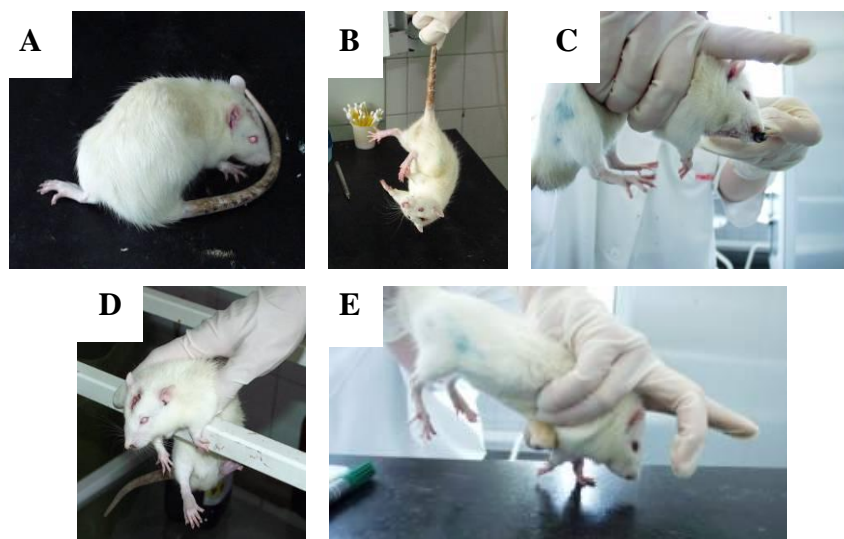
A különböző dózisú PACAP-ot sztereotaxiás készülék segítségével intracerebroventricularisan (icv) adtuk be, az oldalkamrába a permanens okklúzió előtt közvetlenül (Paxinos és Watson, 1982). A kontroll csoport állatai 2 μ l fiziológiás sóoldatot kaptak (n=10), míg a PACAP-pal kezelt állatok 2 μ l-ben oldott 0,25 μ g (n=8); 0,5 μ g (n=10); 1 μ g (n=10) vagy 2 μ g (n=9) PACAP-ot, közvetlenül az érelzárás előtt. Az infarktus nagyságát először 12 órával az operáció után vizsgáltuk. Mivel az alkalmazott dózisok közül csak a 2 μ g PACAP bizonyult hatékonynak, ezért vizsgálatunk második felében ezzel a dózissal kezeltük az állatokat (n=12), és 24 órával az operáció után vizsgáltuk az infarktus nagyságát. A kontroll csoport 2 μ l fiziológiás sóoldatot kapott (n=12). A preventív PACAP kezelés hatásának vizsgálatához a 2 μ g PACAP-ot naponta egy alkalommal ugyanazon időpontokban (13 és 15 óra között) adtuk be 7 napon keresztül (n=18). A kontroll állatok itt is 2 μ l vívínyanyagot kaptak (n=18). Végül a PACAP

kezelés hatékonyságát összehasonlítottuk ugyanilyen dózissal VIP kezelés hatékonyságával (n=12).

II.1.3. Magatartási vizsgálatok

Általános magatartási vizsgálatok

Az állatok magatartási jeleit teszteltük 1 nappal a permanens (n=18) vagy 90 perces tranziens (n=18) MCAO előtt; a műtét után 2, 4, 6, 12 órával, valamint 1, 2, 3, 5, 7, 10 és 14 nappal. Emellett naponta mértük a testsúlyt. Összeállítottunk egy 16 paramétert vizsgáló tesztskálát a leggyakrabban használt tesztek közül (Garcia et al., 1995; Menzies et al., 1992; Petullo et al., 1999; van der Staay et al., 1996; Zausinger et al., 2000) (**II.3. ábra**). A tesztelés pontszáma a normál állatokban 0, maximális károsodásnál pedig értéke maximum 42. Mivel az okklúzió a bal oldalon volt, az állatok jobb oldalán észleltük a kóros jeleket. A tesztelés részletes leírása az ebből született közleményben található (Reglődi et al., 2003). Röviden összefoglalva: a tesztskála segítségével pontoztuk a poszturális jeleket (mellső végtag flexió 0-2 pont, törzsforgás 0-2 pont); a lokomotoros aktivitás zavarát (forgás 0-5 pont, döntött rácson mászás 0-4 pont, spontán aktivitás 0-5 pont); féloldali mozgástendenciát (toló ill. húzóerőre féloldali járás 0-2 pont); végtag ráhelyezést (féloldali ráhelyezési reflex mellső és hátsó végtaggal 0-2 pont); egyensúlyozási képességet (3 különböző tesztben 0-3, 0-4 vagy 0-5 pont); izomerőt, izomtónust (oldalirányú erő ellenében kifejtett izomerő 0-2 pont, kapaszkodási erő 0-1 pont) és érző reflexeket (kapaszkodási reflex és fájdalomingerre végtagelhúzási reflex 0-1 pont). A vizsgálatot elvégeztük 2µg icv PACAP-pal kezelt állatokon is.



II.3. ábra. Reprezentatív fotók egyes funkcionális tesztekéről éreketőtt állatban. (A) féloldali törzsforgás; (B) féloldali felső végtag flexió; (C) aszimmetrikus kapaszkodási reflex; (D) egyensúlyozási zavar; (E) féloldali ráhelyezési reflex.

Orientációs tesztek

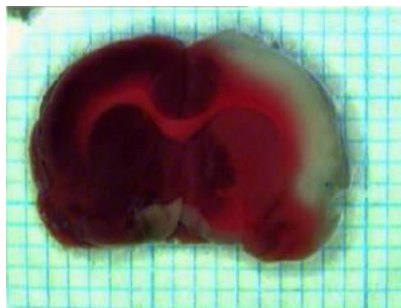
Annak érdekében, hogy még pontosabban vizsgáljuk az ischaemia után kialakuló neurológiai eltéréseket és szenzomotoros változásokat, orientációs tesztek is végeztünk. A kísérlet során az első csoport 2 μ l fiziológias sóoldatban oldott 2 μ g PACAP-ot (n=8), a második csoport 2 μ l icv sóoldatot kapott (n=6), majd elzártuk az a. cerebri media eredését. A harmadik és a negyedik csoport egyedei hasonló kezelést kaptak (PACAP-pal kezelt n=6, kontroll n=6), de itt csak áloperációt végeztünk. Az állatok különböző szenzoros stimulusokkal kiváltott orientációját két nappal az operáció után vizsgáltuk. A normál állatok az inger hatására fejüket az inger felé fordították, vagy fülüket, bajszukat vagy végtagjaikat mozgatták (Lénárd et al., 1982; Marshall et al., 1971). A vizsgálat során a következő stimulusokat alkalmaztuk: (1): az állatok bajszát, elülső és hátsó testfelét mindkét oldalon kis vattaszállal érintettük; (2): vizuális ingerként egy 4x4cm-es fekete-fehér csíkos kártyát mozgattunk a szemük előtt; (3): végül akusztikus ingerként mindkét fül mellett kopogó hangot alkalmaztunk. A kísérlet során mértük az állatok reakcióidejét másodpercben.

II.1.4. PACAP hatásának vizsgálata a lokális kortikális keringésre

A parietális cortex keringését mértük lézer dopplerrel, melyet gyakran használnak a lokális agyi keringés akut változásainak detektálására (Dirnagl et al., 1989). A bregmatól 1mm-re posterior irányban és 5mm-re balra 1mm átmérőjű nyílást fűrtünk, majd a detektort az ép dura felszínére helyeztük. Az állatok bal oldalkamrájába 2 µg PACAP-ot vagy fiziológiás sóoldatot injektáltunk (n=6), és a lokális agyi keringés változását 1 órán keresztül mértük. Az értékeket a beavatkozás előtt mért értékek százalékában adtuk meg.

II.1.5. Morfológiai analízis

A vizsgálattól függően 12, valamint 24 órával a műtét után az állatok agyát eltávolítottuk, 98%-os izoamil alkoholban -20°C-on fagyasztottuk, majd szeletelő mátrix segítségével 6 db 2mm-es szeletet készítettünk. Az elhalt területek és az épen maradt részek arányának pontos megállapításához 2%-os fiziológiás sóoldatban oldott 2,3,5-trifeniltetrazólium kloridot (TTC) használtunk, amibe 20 percre beletettük a szeleteket, majd 10%-os formalinban fixáltuk. A festék a mitokondriális reduktázok kimutatására alkalmas, melyek az ép sejtekben a tetrazolium sót egy sötétvörös vegyületté alakítják át. Az elhalt sejtekben ez az enzim nem működik, ezért a terület nem festődik, fehér marad (Bederson et al., 1986; Benedek et al., 2006) (**II.4. ábra**). A festett agyszeletekről készült digitális képeket NIH Image program segítségével analizáltuk. Az elhalt terület nagyságát az egész agyterület százalékában adtuk meg.



II.4. ábra. TTC-festett agyszelet. Az ép terület piros, az infarktusos terület fehér.

II.2. NEURODEGENERATÍV BETEGSÉGEK ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJÉN VÉGZETT KÍSÉRLETEK

II.2.1. A Parkinson-kór modellezése a substantia nigra 6-OHDA-nal való roncsolásával

A 6-OHDA-indukálta substantia nigra károsodás kor- és nemfüggésének vizsgálata

A Parkinson-kór modellezéséhez 4µg/µl koncentrációjú 6-OHDA oldatot használtunk, melyből Hamilton tűvel 2µl-t fecskendeztünk be a bal oldali substantia nigrába (Paxinos és Watson, 1982). A féloldali substantia nigra roncsolást először fiatal hím Wistar patkányokon (2 hónapos, 220-250g, n=24) végeztük. Később vizsgáltuk a modellt fiatal nőstényeken (n=10), illetve idős állatokon (18-20 hónapos hím és nőstény, n=8 mindkét csoportban), valamint gonadektómiát követően mindkét nemben. Az ovariectómiát (OVX) (n=20), illetve a kasztrációt (n=20) 2 hónapos korban végeztük el, melyet 3 héttel később követett a 6-OHDA lézió.

A PACAP hatásának vizsgálata féloldali substantia nigra lézióban

Sztereotaxiás készülék segítségével fiatal hím állatok substantia nigrájába fecskendeztünk PACAP-ot közvetlenül a roncsolás előtt (1µg; 0,1µg; vagy 0,01µg PACAP 0,5µl sóoldatban oldva, n=12 minden csoportban). A kontroll állatok 0,5µl fiziológiás sóoldatot kaptak (n=8). Tekintve, hogy egyes neuroprotektív szerek is kor- és nemfüggést mutathatnak, kísérleteinket megismételtük idős hímeken, fiatal és idős nőstény patkányokon, valamint gonadektomizált állatokon (n=10 minden csoportban). Ezekhez a kísérletekhez azt a PACAP dózist használtuk, mely első kísérleteinkben a leghatásosabbnak bizonyult (0,1µg).

II.2.2. A PACAP hatásának vizsgálata striatális quinolinsav roncsolással előidézett Huntington-chorea modellben

A Huntington-chorea modellezéséhez 200-250g súlyú hím Wistar patkányokat használtunk (n=22). Az állatok bal oldali striatumát 180nmol/2µl koncentrációjú quinolinsavval roncsoltuk. A sztereotaxiás műtét koordinátái: bregma ponttól 1,3mm-re caudálisan, 3mm-re balra és a kemény agyhártyától 5mm-re az agyalap felé (Paxinos és

Watson, 1982). A PACAP-ot 2 μ l fiziológiás sóoldatban oldottuk fel, és Hamilton fecskendő segítségével juttattuk be a striatumba a roncsolást közvetlenül megelőzően (0,2 μ g PACAP n=7, 2 μ g PACAP n=8). A kontroll csoport állatai 2 μ l fiziológiás sóoldatot kaptak (n=7).

II.2.3. Magatartási vizsgálatok

Open-field teszt

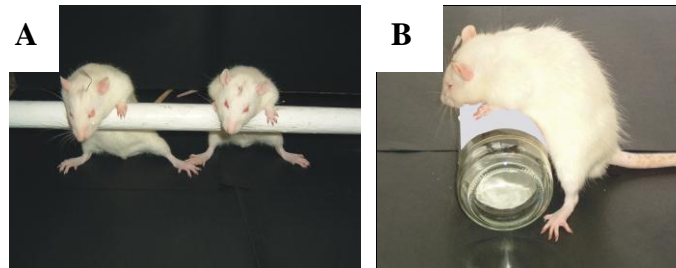
Az állatok a Parkinson-kór modellben a műtét után jellegzetes hypokinetikus tüneteket mutatnak, míg a Huntington-chorea ezen modelljében az állatok hyperkinetikusak. Emellett mindkét modellben a féloldali léziónak megfelelően, jellegzetes aszimmetrikus tünetek lépnek fel. Ennek vizsgálatára open-field tesztet használtunk. Az állatokat egy 45x45x50 cm-es open-fieldbe helyeztük, és viselkedésüket 15 percig videóra rögzítettük. A következő paramétereket mértük: a motoros aktivitás jeleként az aktivitással eltöltött időt, a nyugalmi időt, a megtett távolságot, a forgások és az ágaskodások számát. A féloldali tünetek közül a bal és jobb oldalra történő forgások számát, a bal és jobb oldali felső végtag támasztó használatát az ágaskodás során, valamint a bal és jobb oldallal történő fal melletti mozgás idejét (thigmotaxis) értékeltük. Mivel a műtét után mutatott akut hypokinetikus és aszimmetrikus jelek spontán javulást mutatnak pár nap elteltével, a videofelvételeket a műtét előtt (0. nap), a műtétet követő 1. és 10., valamint a Huntington-chorea modellben a 30. napon is megismételtük.

Apomorfín teszt

A Parkinson-kór modellben apomorfínnal indukált forgási tesztet is végeztünk a műtét utáni 2. héten. Az egyoldali roncsolás miatt oldalkülönbség alakul ki a dopamin receptor agonista apomorfínnal szembeni érzékenységre (Mokrey, 1995). Az állatok subcutan (sc) 0,1mg/kg apomorfint kaptak, mely a lézióval ellentétes oldalra irányuló forgó mozgást váltott ki. Ezt a beadást követően 30 percig ellenőriztük, számoltuk a 360°-os jobbra irányuló forgások számát. Mindezen motoros tesztekkel a lézió súlyosságára, illetve a javulási tendenciára tudtunk következtetni.

Katalepszia teszt

A Huntington-chorea modellben a műtét után 3 héttel haloperidol indukálta katalepszia tesztet is végeztünk. Az állatokat ip 0,5mg/kg haloperidollal kezeltük és két órával a beadást követően végeztük el a teszteket. A katalepszia teszt során az állatokat három különböző nehezített testhelyzetbe állítottuk be, és mértük a mozdulatlansággal eltöltött időt (Sanberg et al., 1988). Az első két tesztben az állatok mellső mancsait egy 7cm magasan elhelyezkedő és 3cm átmérőjű (**II.5.A. ábra**), illetve egy 10cm magasan elhelyezkedő és 4cm átmérőjű rúdra helyeztük úgy, hogy a hátsó végtagjaik a földön maradtak. A harmadik helyzetben egy 7cm átmérőjű, oldalára fektetett üvegre helyeztük az állatok mellső végtagjait, és így mértük a mozdulatlanság idejét (**II.5.B. ábra**).



II.5. ábra. Reprezentatív fotók a katalepszia tesztről. (A) alacsony rúd teszt; (B) üvegteszt.

II.2.4. Szöveti feldolgozás

A Parkinson-kór modellben a magatartási teszteket követően az állatokat 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk, majd vibratómmal 50µm-es sorozatmetszeteket készítettünk mindkét oldali mesencephalon területéből, mely magában foglalta a substantia nigra teljes területét és a ventrális tegmentális területet. Az immunhisztológiai festéshez primér antitestként tirozin-hidroxiláz (TH) antitestet (Schwartz és Huston, 1996a,b), másodlagos antitestként pedig biotinált antiszérumot használtunk. ABC kittel festettük a metszeteket. A metszetekből készített digitális felvételeken számoltuk a TH-pozitív sejtek számát mindkét oldalon.

A quinolinsav intrastriatális injektálása szelektív neuronális károsodást hoz létre a striatumban. Az aktivitási tesztek befejezése után az állatokat fixáltuk, és az agy striatumot tartalmazó részéből metszeteket készítve, NADPH-diaforáz festéssel megfestettük (Roberts et al., 1993). Mind a kontralaterális, mind az ipsilaterális oldalon a striatum területén megszámloltuk a NADPH-diaforáz pozitív sejteket. Ezután a sérült oldal sejtszámát az ép oldal sejtszámának százalékában adtuk meg.

II.3. A PACAP RETINOPROTEKTÍV HATÁSAINAK VIZSGÁLATA

II.3.1. Excitotoxicus retinakárosodás előidézése nátrium-glutamáttal (MSG) és PACAP hatásának vizsgálata

Az MSG újszülöttkorban még átjut a vér-retina gáton, és súlyos retinadegenerációt indukál. A kezeléseket ezért újszülött Wistar patkányokon az 1. vagy 5. posztnatális napon egyszer, az 1., 5. és 9. napon 3 alkalommal, vagy az 1., 3., 5., 7., és 9. napon ötször ismételtük meg sc 2mg/g MSG-vel (n=75). A PACAP kezelést a legtöbb esetben intravitreálisan végeztük (**II.6. ábra**). Az állatok jobb szemébe Hamilton tűvel injektáltunk 5µl fiziológiás sóoldatban oldott PACAP-ot közvetlenül az MSG kezelés után (1 vagy 100pmol, n=30). A kezelés egyszeri, kétszeri vagy háromszori volt. A PACAP dózisát egy olyan kísérletre alapoztuk, ahol a PACAP hatását nervus opticus lézióban vizsgálták (Seki et al., 2003). Későbbi kísérleteinkben a leghatékonyabbnak bizonyult 100pmol-os PACAP dózist használtuk 3xMSG kezelés mellett. Egyes kísérleteinkben vizsgáltuk a PACAP antagonistá PACAP6-38 hatását PACAP kezelés mellett. Ugyancsak vizsgáltuk a PACAP fragmenseinek hatását MSG lézióban (100pmol PACAP1-27, n=10, 1nmol PACAP6-38 és 6-27, n=18). A szisztémás kezeléshez a PACAP fejlődést serkentő dózisát használtuk (II.4.1. fejezet), 1µg PACAP/nap, 14 napon keresztül (n=15).

II.3.2. Ischaemiás retinakárosodás előidézése és a PACAP hatásának vizsgálata

A retina ischaemiát permanens bilaterális carotis okklúzióval (BCCAO) idéztük elő. A bilaterális carotis leköttést felnőtt Wistar patkányokon (250-400g) végeztük (n=29), amely során középvonali nyaki feltárással mindkét oldali a. carotis communist 3-0-ás sebészeti fonállal permanensen leköttöttük. A PACAP kezelés során 100pmol PACAP-ot juttattunk 5µl sóoldatban feloldva a corpus vitreumba (n=16). Normál kontrollként áloperált állatokat használtunk (n=16). Egyes kísérleteinkben vizsgáltuk a PACAP antagonistá PACAP6-38 hatását a PACAP kezelés mellett (1nmol, n=6).



II.6. ábra. Intravitreális kezelés Hamilton tűvel.

II.3.3. Szövettani analízis

Rutin szövettani analízis

Újszülött patkányok MSG kezelésekor a kezelést követően három hét után a szemeket eltávolítottuk, és az izolált retinát szövettani vizsgálatoknak vetettük alá. BCCAO után két héttel végeztük el a szövettani feldolgozást. A szemserleg preparátumokat 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, majd mosás és dehidráció után a mintákat propilén-oxid–Durcupan ACM-gyantába ágyaztuk és ultramikrotómmal készített 2-3 μ m-es metszeteket toluidinkékkel festettük meg. A morфомetriai méréseket Spot Basic program segítségével végeztük. A retina rétegek vastagságának értékeléséhez NIH Image 1.55 programot használtunk, a különböző rétegek vastagságát a retina azonos régióiból készült metszeteken mértük. A mérések egyenként 6 retina blokkjából készültek (n = 5-10 mérés/retinablokk). A következő paramétereket mértük: (i): a retina keresztmetszete a pigmenthámtól a belső határmembránig; (ii): a külső határmembrántól a belső határmembránig (outer limiting membrane-inner limiting membrane=OLM-ILM); (iii): az ONL (outer nuclear layer=külső magvas réteg); (iv): OPL (outer plexiform layer=külső rostos réteg); (v): INL (inner nuclear layer=belső magvas réteg); (vi): IPL (inner plexiform layer=belső rostos réteg) vastagsága; és (vii): a 100 μ m retinahosszra eső GCL rétegben (ganglionic cell layer=ganglionsejtek rétege) található sejtek száma.

Immunhisztokémiai analízis

A fixált szemserlegpreparátumokat fagyasztómédiumba helyeztük, és 10 μ m-es kriosztát sorozatmetszeteken előinkubálás után a következő mono- vagy poliklonális primér antitesteket alkalmaztuk: vezikuláris glutamát transzporter-1 (VGLUT-1, 1:500), vezikuláris GABA transzporter (VGAT, 1:500), calretinin (CALR, 1:1000), calbindin

(CALB, 1:500), parvalbumin (PARV, 1:1000), gliális fibrilláris savas protein (GFAP, 1:500), protein kináz C α (PKC α , 1:200). Ezt követően a metszeteket 2 órára, szobahőmérsékleten, sötétben szekunder antitesttel (FITC=fluoreszcein izothiociánát, Texas-Red, 1:100) vontuk be.

II.3.4. A PACAP retinoprotektív hatásának vizsgálata teknős retinán

A bevezető kísérletben annak meghatározása volt a célunk, hogy a PACAP milyen mennyiségben fordul elő a teknős (*Pseudemys scripta elegans*) idegrendszerében és perifériás szerveiben. Ehhez a már korábban standardizált RIA módszert használtuk. Antiszérumként a Dr. Arimura által kifejlesztett PACAP38 antiszérumot (88111-3) használtuk. Kontrollként patkány idegrendszert használtunk, ahol korábbi kísérletek alapján már ismert volt a PACAP koncentrációja (Arimura et al., 1991).

Annak vizsgálatára, hogy a retina túlélését képes-e a PACAP befolyásolni, teknősből nyert izolált szemserleg szeleteket használtunk. Ezek egyik felét nem-oxigenizált Ringer oldatba helyeztük, másik felét kiegészítettük 0,165 μ M PACAP-pal. Az intracelluláris elvezetések izolált szeletek horizontális sejtjeiből a szem eltávolítása után 18, 22, 42, és 46 órával végeztük. Az 500ms időtartamú fehér fényű stimulus 5500ms-os intervallumon belül kétszer vetült a retinaszeletre. A fény-kiváltott válaszokat amplifikáltuk, a horizontális sejteket a fénystimulusra adott hyperpolarizáció válaszaik alapján azonosítottuk, majd teszteltük a spektrális szenzitivitást.

II.4. A KORAI IDEGRENDSZERI FEJLŐDÉS FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA POZITÍV ÉS NEGATÍV HATÁSÚ KÖRNYEZETBEN

II.4.1. Újszülöttkori PACAP1-38 és PACAP6-38 kezelés

A PACAP kezelt patkányok sc injekció formájában 100 μ l fiziológiás sóoldatban oldott 1 μ g PACAP38 (n=18), vagy 10 μ g PACAP antagonistá PACAP6-38 (n=20) kezelést kaptak a születés napjától kezdve két héten keresztül minden nap. A kontroll állatok csak fiziológiás sóoldatot kaptak (n=14). A kezelés során alkalmazott dózist munkacsoportunk korábbi eredményei és irodalmi adatok alapján választottuk (Tamás et al., 2004; Telegdy et al., 2000; Vaudry et al., 1999).

II.4.2. Újszülöttkori MSG kezelés

A nátrium-glutamátot sc injekciós formában adtuk 100µl fiziológias sóoldatban oldva az 1., 3., 5., 7., 9. illetve 1., 5., 9. posztnatális napokon. Irodalmi leírásoknak és saját korábbi megfigyeléseinknek (Babai et al., 2005, 2006; Kiss et al., 2005, 2006; Klingberg et al., 1987; Kubo et al., 1993) megfelelően választottuk az alkalmazott dózisokat: a 4 mg/testtömeg g dózist (n=30). A kontroll állatok ugyanezek a napokon 100µl fiziológias sóoldatot kaptak (n=15). Külön állatcsoportot használtunk az újdonságkereső magatartás vizsgálatához (n=12 kontroll és MSG-kezelt állat).

II.4.3. Az MSG és PACAP kezelés kombinációja

Ebben a kísérletben a patkányok a posztnatális 1., 5. és 9. napon 4 mg/testtömeg g MSG-t, és 1-14 napos korban napi 1µg PACAP-ot kaptak sc injekcióban (n=15).

II.4.4. Neonatális hypoxiás/ischaemiás lézió

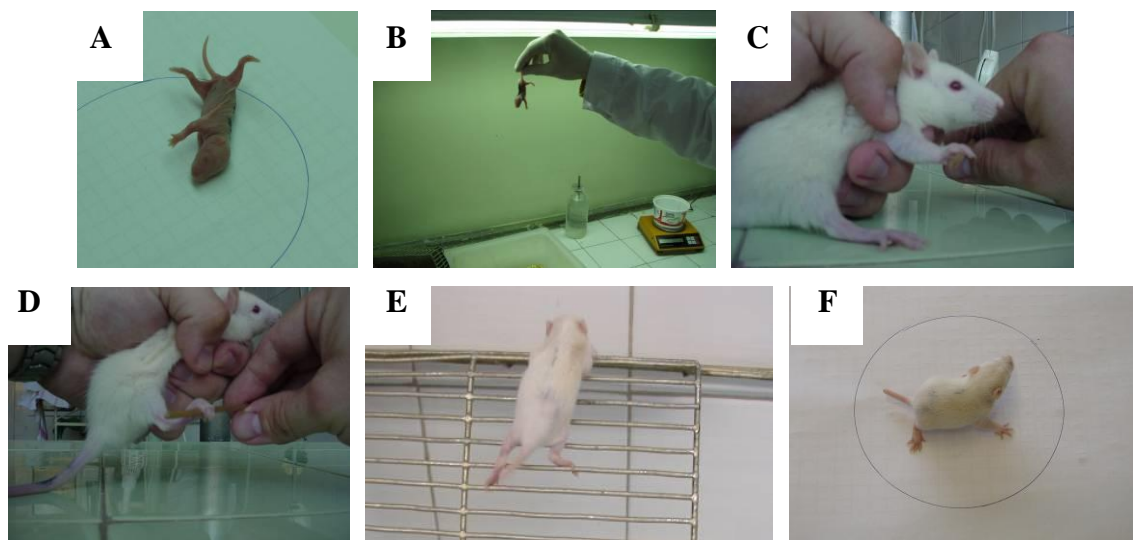
Ehhez a kísérlethez 7 napos Wistar patkányokat használtunk (n=12). Operációs mikroszkóp alatt egy középvonali nyaki metszésen át felkerestük a bal oldali a. carotis communist és a nervus vagustól való óvatos szétválasztást követően permanensen lekötöttük (Yager et al., 1993). Az állatok testhőmérsékletét a beavatkozás során folyamatosan 37°C-on tartottuk. A műtét után az állatokat egy 8% oxigént és 92% nitrogént tartalmazó kamrába helyeztük 2 órára. Az áloperált kontroll egyedeknél a nyaki bemetszést követően felkerestük az a. carotis communist, de nem kötöttük le (n=12). A műtét után normál légköri levegőn töltöttek 2 órát. Ezt követően visszahelyeztük az állatokat az anyjuk mellé.

II.4.5. A korai idegrendszeri fejlődés vizsgálata: szomatikus és reflexfejlődés

Az idegrendszeri fejlődés vizsgálatát ismert tesztek segítségével végeztük. Összeállítottunk egy, a lehetőség szerint legtöbb paraméterből álló tesztskálát, melynek segítségével a szomatikus és reflexfejlődés, valamint a motoros koordináció fejlődése a legjobban nyomon követhető (Altman és Sudarshan, 1975; Dam et al., 2000; Hill et al., 1991; Smart és Dobbing, 1971a,b). A neurológiai fejlődést naponta 12 és 15 óra közötti

időpontban vizsgáltuk, a kezelési periódusban a napi kezeléseket megelőzően (**II.7. ábra**).

Naponta mértük a testsúlyt, valamint lejegyeztük a szemnyitás, a metszőfogkinövés és a fül kiegyenesedésének napját. A reflexfejlődés vizsgálatához a következő reflexek megjelenési napját vizsgáltuk: (1): Felegyenesedési (righting) reflexek (a) a hátról négy mancsra való érzékelés, (b) 50cm magasból fejjel lefelé egy szivacsra ejtve az állatokat, a négy végtagjukra érzékelés. (2): Negatív geotaxis: az állatokat egy 45°-ban megdőntött, 30cm magas rács közepére helyeztük fejjel lefelé. Feljegyeztük azt a napot, amikor a patkány megfordult, és felmászott a rács tetejére. (3): Keresztezett extenzor reflex: fájdalomingert alkalmazva a bal hátsó végtagon (csipeszcsípés), vizsgáltuk az állat reakcióját. Azt a napot jegyeztük fel, amikor látszólag eltűnt a keresztezett extenzor reflex, az állat az egyszerű reflextevékenységnél bonyolultabb, összetettebb mechanizmusú elhárító magatartással válaszolt az inzultusra. (4): Fülrángás reflex: vattapálcával megérintettük a fül szélét, és az erre bekövetkező fülrándítás megjelenésének napját regisztráltuk. (5): Szemhéjreflex: vattapálcával megérintettük a szemrést, és a válaszként bekövetkező izomkontrakció megjelenésének napját regisztráltuk. (6): Végtag kontakt ráhelyezési (placing) reflex: a mellső és a hátsó mancs dorsális felszínét a vizsgálóasztal széléhez érintettük, és feljegyeztük azt a napot, amikor az állat először felemelte az adott végtagot és ráhelyezte az asztalra. (7): Taktilis fogóreflex (grasping): egy vékony rúddal érintettük a patkány mellső és hátsó végtagjának ventrális felszínét, és regisztráltuk az első napot, amikor erre az érintésre a rúd megragadásával válaszolt. (8): Elmozdulási reflex: egy 13cm átmérőjű fehér papírkorong közepére helyeztük az állatokat. A jel megjelenésének napjától kezdve mértük azt az időt, ami alatt az állat mindkét mellső mancsa elhagyta a korong területét (maximum 30 perc). (9): Akusztikus megrettenési reflex: regisztráltuk az első napot, amikor az állat egy hirtelen hangingerre (taps) összeherezett. Egyes reflexek esetén a reflex teljesítési idejét is mértük naponta (felegyenesedési reflex, negatív geotaxis és elmozdulási reflex).

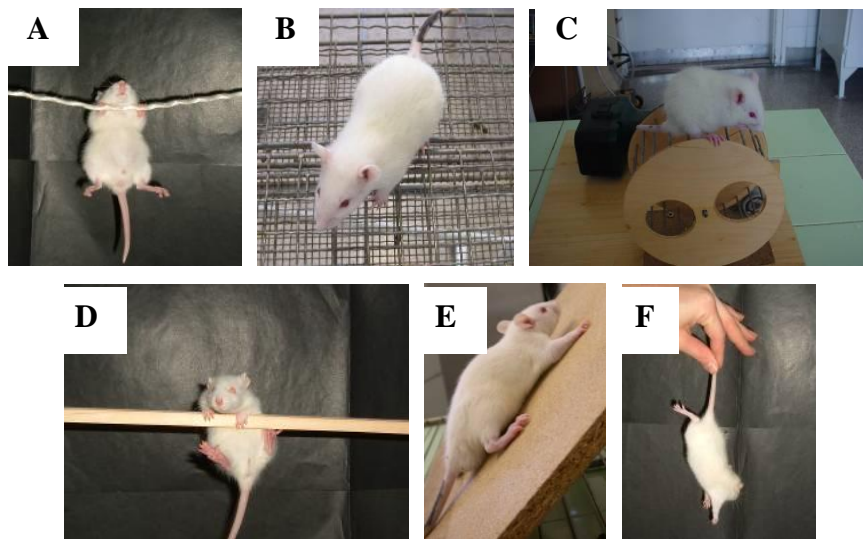


II.7. ábra. Reprezentatív fotók a reflexfejlődés vizsgálatáról. (A,B) Felegyenésedési reflexek; (C,D) mellső illetve hátsó végtagi fogóreflex; (E) negatív geotaxis; (F) elmozdulási reflex.

II.4.6. A motoros koordináció vizsgálata

A következő motoros koordinációs tesztek elvégeztük el 3-5 hetes korban: (1): Lépésszám és lépéshiba teszt: 1 méter magasan, 20x40cm területű, 2x2cm-es méretű rozsdamentes acélrácsra helyezve az állatokat, 1 perces időtartam alatt feljegyeztük az összes lépés számát, illetve a lépéshibáikat, azaz amikor a rács hézagaiba ejtették a végtagjukat. (2): Mókuskerek (rotarod) teszt: egy 14cm átmérőjű mókuskereket egy motorral hajtottunk meg 13rpm sebességgel, és mértük az időt amíg az állat a kerék tetején fenn tudott maradni (maximum időtartam 2perc). (3): Mozgás iniciációs teszt: a patkányokat egy vízszintes felszínre helyeztük, melyen egy 10cm-es belső, és egy 45cm átmérőjű külső kör volt megjelölve. Mértük a mozgás kezdés idejét (ami alatt elhagyta a belső kisebb kör területét) és a nagyobb kör elhagyásának idejét is. (4): Függeszkesztési teszt kötél: egy 40cm magasságban vízszintesen kifüggesztett 4mm átmérőjű nylon kötéltre helyeztük az állatok mellső végtagjait. Mértük az időt ameddig kapaszkodva fenn tudtak maradni a kötélre (maximum 30mp). A hypoxiás/ischaemiás léziós csoportban elvégeztük a tesztet úgy is, hogy az állatok csak a kontralaterális végtagjukkal kapaszkodhattak, mégpedig úgy, hogy a lekötéshez képest ipszilaterális mancsukat (a balt) leragasztottuk, hogy ne tudjanak fogni vele. (5): Kapaszkodási teszt megdőlt deszkán: 45°-ban döntött farostlemez deszkára helyeztük az állatokat, majd körülbelül 5 fokként emeltük a dőlésszöveget. Azt a fokot jegyeztük fel, ahol az állatok még fenn

tudtak maradni a deszkán legalább 5mp-ig. (6): Függőleges rács teszt: a patkányokat egy 50x22 cm-es méretű, 15mm-es rácsközű rács közepére helyeztük vízszintes helyzetben, majd a rácsot függőleges helyzetbe hoztuk kb. 2mp alatt, ezt követően még 5mp-ig figyeltük. Ha az állat 5mp után is fennmaradt a rácson, akkor 0; ha a megfigyelési idő alatt, 1; ha azonnal, vagy még a vízszintből függőleges helyzetbe hozás közben leesett, 2 pontot adtunk teljesítményére. (7): Testkilengés teszt: a patkányokat farkuknál fogva a levegőbe emeltük, de az asztallaptól nem távolítottuk messzebb, mint 3-5cm. 30 mp-en át figyeltük az állatok magatartását. Feljegyeztünk ezalatt minden, a függőlegeshez képest körülbelül 10 foknál nagyobb elmozdulást mindkét irányba. (8): Egyensúlyozás teszt: az állatokat egy négyszögletes alakú rúdra helyeztük (1x1x40cm, a talajtól 40cm magasságban), a rúd végein 2 platform, melyekre kimászhattak. Mértük az időt amíg fenn tudtak maradni a rúdon (maximum 120mp) (**II.8. ábra**).



II.8. ábra. Reprezentatív fotók a motoros koordináció teszteléséről. (A) függeszkedési teszt; (B) lépéshiba teszt; (C) mókuserék teszt; (D) egyensúlyozási teszt; (E) kapaszkodási teszt megdőntött deszkán; (F) testkilengés teszt.

II.4.7. Open-field teszt

Az állatok motoros és felfedezési viselkedését vizsgáltuk ezzel a teszttel, általában 3-6 hetes korig. A patkányokat egy nyitott térbe („open-field”) helyeztük, ami egy 42x42cm-es, 31cm magas fallal körülvett doboz volt (**II.9. ábra**). A doboz alapját 8x8-as zónákra osztottuk. Az open-field megvilágítása egyenletes volt (200lux). Az egyedeket a tér közepére helyeztük, mozgásukat videókamerával rögzítettük (5 perc). A

videofelvételeken a következőket mértük: megtett távolság, aktivitással és nyugalomban töltött idő, habituáció, központban és a fal mellett töltött idő, ágaskodások és fejemelések száma.



II.9. ábra. Open-field teszthez használt tér bemutatása. A sávozott terület a centrális zónákat mutatja.

II.4.8. Újdonságkereső magatartás vizsgálata

Az újdonságkereső viselkedést egy, az open-field egyfajta variációjának megfelelő módszer segítségével vizsgáltuk MSG-kezelt állatokban. A tesztelés 3 hetes életkorban történt, az irodalomban közölt kísérleti protokollnak megfelelően (Heyser et al., 2004). A teszt 4 egymást követő 5 perces próbából épül fel, melyek között 3 perces szüneteket tartottunk. A doboz alapterülete ugyanaz, mint a korábban leírt open-field-ben. Az első próba az akklimatizációt szolgálta, az open-field tesztnél leírtakkal mindenben megegyezően, tárgyat nem helyeztünk a dobozba. A 2. próbában két egyforma üvegtárggyal bővítettük a kísérleti elrendezést. A kísérleti elrendezést változatlanul hagytuk a 3. próbában. A 4. próba előtt az egyik, már az állat által ismert üveget eltávolítottuk, és helyére egy új, más alakú, méretű és színű műanyag tartályt helyeztünk a dobozba (*II.10. ábra*). Minden próba során kamerával rögzítettük az állatok viselkedését. A következő paramétereket értékeltük: mozgással töltött idő, kockaváltások száma, habituáció, a centrumban és a periférián töltött idő. Központi zónának a tárggyal közvetlenül érintkező, és az ezekkel szomszédos kockákat tekintettük. A 4. próbában a régi és az új tárgy közelében eltöltött időt külön-külön értékeltük. A habituációs indexet

az első 90 mp alatt megtett kockaváltások és az összes kockaváltások számának hányadosaként számítottuk ki.



II.10. ábra. Újdonságkereső magatartáshoz használt berendezés bemutatása. (A) open-field tárgy nélkül, 1. próba; (B) két egyforma tárgy a 2. és 3. próbában; (C) új tárgy behelyezése a 4. próbában.

II.4.9. Szövettani vizsgálatok

A glutamát kezelés szövettani verifikációja

A kezelés hatásosságát igazoltuk a szövettani vizsgálattal. Jól ismert, hogy a neonatális glutamát kezelés súlyos idegsejtkárosodást hoz létre az agy különböző területein, a morfológiai eltéréseken kívül biokémiai változásokat is okoz (Gonzalez-Burgos et al., 2001; Kubo et al., 1993; Pesini et al., 2004). Ezen elváltozások közül a nucleus arcuatus és a retina területén bekövetkezett neuronpusztulás vizsgálható a legjobban (Olney, 1969). Ezért mi is rutin szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk a nucleus arcuatuson. A teszteket követően 6 hetes korban 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk az állatokat. A hypothalamus területéről 50 μ m-es frontális metszeteket készítettünk. A metszetek egy részét toluidinkékkel festettük, másik részét TH immunhisztokémiára dolgoztuk fel. Monoklonális egér anti-TH antitest (1:1000) volt a primér antitest, majd 48 óra 4°C-on történt inkubációt követően 1 órán át másodlagos biotinilált antitesttel végül egy avidin-biotinilált peroxidáz komplex-szel (ABC kit) kezeltük.

A hypoxiás/ischaemiás lézió szövettani vizsgálata

A viselkedési teszteket követően 6 hetes korban a fent leírt módon sorozatmetszeteket készítettünk a bregma ponttól 3,8mm anterior és 5,2mm posterior területből, melyeket toluidinkékkel festettünk. A digitális felvételeken mértük a teljes agyterület nagyságát, és külön a cortex, hippocampus, striatum és az oldalkamra méretét mind kontra-, mind ipszilaterálisan Scion Image számítógépes képanalizáló rendszer segítségével. Az

adatokat százalékos értékkel fejeztük ki, a hypoxiás oldal nagyságát az ellenoldali éphez viszonyítva adtuk meg.

II.4.10. Csirkeembriókon végzett PACAP antagonist (PACAP6-38) kezelés hatásának vizsgálata

A csirkeembriókat az embrionális kor első és második felében (E8. és E16. napon) kezeltük. Az *in ovo* injekciókat Hamilton tűvel a chorioallantois membrán alá adtuk steril körülmények között. 20µg PACAP6-38-at 25µl fiziológiás sóoldatban feloldva adtunk E8 (n=46) és E16 (n=10) napos korbán. A kontroll állatok csak sóoldatot kaptak (E8: n=22, E16: n=10) (Bronson et al., 1994; Hocking et al., 2001).

A kikelés után a következő magatartási jeleket vizsgáltuk: általános aktivitás, mint állás, evés, ivás, futás, csipegetés és tollázkodás, az állatok napi kétszeri megfigyelésével 21 napos korig (Hocking et al., 2001). Az open-field tesztet a korábbi fejezetekben leírtakhoz hasonló módon 2 napos és 2 hetes korbán végeztük. A viselkedésminta analízise során a videófelvételről értékeltük a vokalizáció latenciáját, a megtett lépések, az ugrások, a szökési kísérletek, a csipegetések és szárnycsapkodások, a különböző irányú fejforgatások, és a fal melletti és átlós futások számát. 4 és 14 napos korbán teszteltük a szociális magatartást („runway” teszt, Hocking et al., 2001). Az ehhez használt berendezés egy start és egy célboxból állt, melyek egy 2 méteres futófolyosó két végén helyezkedtek el. A célboxban két ismert állat volt, ugyanabból a keltetésből. A tesztelt állat 2 percig a startboxban várt, úgy, hogy a célállatokat láthatta. Majd az ajtó felemelése után mértük azt az időt, mely alatt az állat elérte a célzónát (20 cm-en belül a célboxtól), valamint a célzónában való tartózkodás idejét (**II.11. ábra**).



II.11. ábra. “Runway” teszt bemutatása. A tesztelt állat a startbox felől fut a célbox felé.

II.5. A PACAP NEUROPROTEKTÍV HATÁSMECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL *IN VIVO* ÉS *IN VITRO*

II.5.1. A PACAP antiapoptotikus hatásának vizsgálata *in vivo* stroke modellben TUNEL festéssel

A PACAP ismert *in vitro* antiapoptotikus hatását teszteltük *in vivo* körülmények között. A II.1.1. fejezetben leírt módon fokális cerebrális ischaemiát idéztünk elő (n=24), az állatok fele előzetes icv 2µg PACAP kezelésben részesült a II.1.2. fejezetben leírt módon. Az állatok másik fele csak fiziológiás sóoldatot kapott. 24 órával az okklúzió után 2mm-es agyszeleteket készítettünk, és TTC-vel megfestettük az infarktus nagyságának megítélése céljából, majd a formalin fixálást követően az agyszeleteket tovább vizsgáltuk TUNEL kit felhasználásával. Permeabilizálás után a mintákat FITC-el jelölt dUTP és TdT-vel (terminális deoxinukleotid transzferáz) festettük. A TUNEL-pozitív sejteket 10x0,35mm²-es területeken számoltuk az infarktus magjában (lateralis striatum és az azt körülvevő laterális és dorsolateralis cortex) és a penumbrális területeken (medialis striatum és ventrolateralis cortex), valamint az a. cerebri anterior által ellátott, tehát nem érintett területen (dorsomedialis cortex).

II.5.2. A PACAP molekuláris hatásmechanizmusának vizsgálata *in vivo* glutamát indukálta retinadegenerációban

Az állatok kezelése

A vizsgálatokat újszülött Wistar patkányokon végeztük. A kontroll csoport csak fiziológiás sóoldatot kapott (n=10), míg az állatok más részét intravitreális 100pmol PACAP vagy 1nM PACAP6-38 kezelésben részesítettük (n=10). Az MSG kezelés a II.3.1. fejezetben leírtak szerint történt a posztnatális 1., 3. és 5. napon. Az MSG kezelés mellett az állatok kaptak 100pmol PACAP vagy 100pmol PACAP és 1nM PACAP6-38-at (n=30). A posztnatális 1., 3. és 5. napon a kezeléseket mintavétel követte a 12. valamint a 24. órában. A mintákat Western blot analízissel vizsgáltuk.

Western blot analízis

A retinát jéghideg Tris pufferben (50mM, pH:8.0) homogenizáltuk, amely 0,5mM nátrium-metavanadátot, 1mM EDTA-t és proteázgátlót (1:1000) tartalmazott. Az azonos mennyiségű fehérjét 12%-os poliakrilamid gélben futattuk. A blottolást követően, a nitrocellulóz membránt 3%-os zsírmentes tejben a következő fehérjék elleni antitesteket tartalmazó oldatban egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk: Bad (1:1000), foszfo-Bad (Ser 136) (1:1000), JNK (1:1000), foszfo-JNK (1:2000), ERK (1:1000), foszfo-ERK (1:2000), foszfo-CREB (1:1000), kaszpáz-3 (1:1000), aktív kaszpáz-3 (1:1000), citokróm *c* (1:1000) és AIF (apoptózist indukáló faktor, 1:1000), foszfo-Akt (1:1000), foszfo-PKA (protein kináz A, 1:1000), Bcl-xL (1:1000) és 14-3-3 fehérje (1:1000). másodlagos antitest peroxidáz-konjugált anti-nyúl, valamint anti-egér IgG volt, a vizualizálást ECL (enhanced chemiluminescens labeling) Western blot meghatározó rendszer használatával végeztük el. Az előhívott filmeket NIH's Image J szoftver segítségével értékeltük.

II.5.3. A PACAP antiapoptotikus hatásának vizsgálata PC12 sejteken

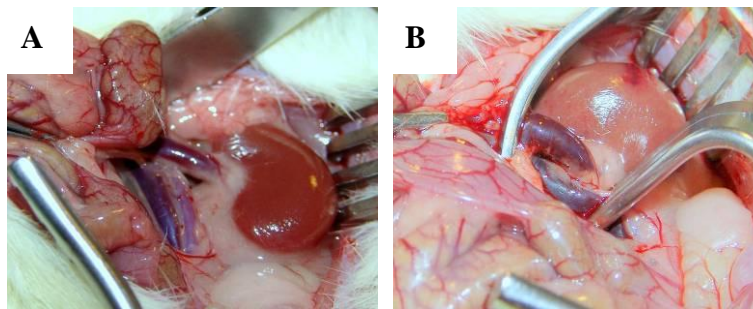
A PC12 sejteket patkány pheochromocytoma sejtvonalból nyertük, és DMEM médiumban tenyésztettük. Az apoptózist 1µg/ml anisomycinnel, fehérjeszintézis gátlóval indukáltuk. A PACAP-ot 1pM-1µM koncentrációban használtuk. Annak vizsgálatára, hogy a PKA útvonal szerepet játszik-e a PACAP-mediálta antiapoptotikus hatásban, egy transzfektált PC12 sejtvonalat is használtunk, mely a PKA egy mutáns formáját expresszálta (A126 klón). A 24 órás inkubációt követően DNS-t extraháltunk, majd DNS létra segítségével vizsgáltuk a DNS fragmentációt.

II.6. A PACAP NEM-NEURONÁLIS PROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA *IN VIVO* ÉS *VITRO*

II.6.1. A PACAP nephroprotektív hatásának vizsgálata ischaemiás vesekárosodásban

Pentobarbital anaesthesia mellett 300-350g súlyú hím Wistar patkányok jobb v. jugularisába Na-heparint (100 IU/tkg) injektáltunk. Iv PACAP-ot (100µg/100µl fiziológiás sóoldatban), vagy ezzel ekvivalens mennyiségű sóoldatot kaptak a renális

ischaemiát közvetlenül megelőzően. A vese ischaemia műtétet teljes median laparotómiában folytattuk, a mesenterium gyök mobilizálását követően izoláltuk a vese ereket (Riera et al., 2001) (*II.12.A. ábra*). Mindkét oldali vesét kirekesztettük 15, 30, 45, 60 és 75 percre (*II.12.B. ábra*). Kontroll állatoknál csak 1 mp-re fogtuk le az ereket (n=10 minden csoportban). 16 nap után a túlélő állatok veséit szövettani feldolgozás céljából eltávolítottuk és 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk. 10µm vastagságú sorozat metszeteket készítettünk haematoxylin-eosin festéssel. A szövettani metszeteken a tubularis károsodás mértékét a Banff szerinti beosztás alapján értékeltük (Danovitch 2005).



II.12. ábra. Műtéti képek a vese ereinek lekötéséről. (A) a vese erek feltárása; (B) az erek lekötése.

II.6.2. A PACAP hatásának vizsgálata oxidatív stressz indukálta endothelsejt károsodásban, valamint oxidatív stressz és ischaemia/reperfúzió indukálta szívműködési károsodásban

Az EOMA CRL-2586 egér hemangioendotheliomából nyert endothel sejtvonalat használtuk (ATCC). A primér szívműködési kultúrát újszülött patkányok szívéből nyertük, kollagenázos emésztést követően. A sejteket DMEM/F12 médiumban tenyésztettük.

A sejtek életképességének vizsgálata

A szívműködési és endothel sejtek életképességének vizsgálatához kolorimetrikus MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium bromid) tesztet használtunk. A sejteket hat különböző kezelésnek tettük ki 1.) kontroll csoport kezelés nélkül; 2.) 20nM PACAP; 3.) 250nM PACAP receptor antagonist (PACAP6-38); 4.) H_2O_2 ; 5.) H_2O_2 +20nM PACAP; 6.) H_2O_2 +20nM PACAP+250nM PACAP6-38. Az endothelsejtekben 0,5mM H_2O_2 , míg a szívműködési sejtekben 1mM H_2O_2 koncentrációt használtunk. A 4 órás kezelést követően a médiumokat lecseréltük egy 0,5mg/ml koncentrációjú PBS-ben oldott MTT-re, melyben

3 óráig tartottuk a sejteket. Ezt követően egy SIRIO ELISA leolvasóval 570 nm hullámhosszon megmértük a képződött kék formazán festék mennyiségét, amely arányos volt az élő sejtek számával. Egy további vizsgálatban a szívizomsejteket *in vitro* ischaemia/reperfúciónak tettük ki. A csoportok a fentiekhez hasonlóak voltak, csak a H₂O₂ kezelés helyett 60 perces speciális ischaemiás puffer kezelést alkalmaztunk, melyet 120 perces normál médium (reperfúzió) kezelés követett (Gordon et al., 2003).

Az EOMA sejtek életképességét további élő/halott teszt segítségével határoztuk meg. A sejteket calcein-AM-t (5µl/10ml PBS) és ethidium homodimer-1-t (20µl/10ml PBS) tartalmú pufferben inkubáltuk. Az ethidium homodimer-1 egy nagy affinitású, piros fluoreszcens nukleinsav festék, amely csak a halott sejtek sérül membránján képes átjutni, és a magban dúsul. A calcein-AM egy membrán fluoreszcens festék, amely az élő sejtek észteráz aktivitása következtében a membránon áthatolni nem képes zöld-fluoreszcens terméké alakul, ezáltal az ép membránú sejtek citoplazmájában dúsul.

Apoptózis és nekrosis kimutatása annexin V és propidium jodid festéssel

Az apoptózis számos morfológiai változással jellemezhető, melyek közül legkorábban a plazmamembrán változás észlelhető. Az apoptotikus sejtek membránjában a foszfolipid-foszfátidilszerin a belső felszínről a külső felszínre transzlokálódik. Az annexin-V igen magas affinitást mutat a foszfolipid-foszfátidilszerinhez. A FITC-cel jelzett annexin-V felhasználható az apoptotikus sejtek flow citometriás kimutatására. Az annexin-V-t vitális propidium jodid festéssel együtt kombináltuk és így az annexin-V pozitív apoptotikus sejtek elkülöníthetővé váltak a propidium jodid pozitív nekrotikus sejtektől (Vermes et al., 2000). A mintákat BD FACS Calibur flow citométerrel vizsgáltuk, az analízishez Cellquest software-t használtunk. Kvadráns dot plot segítségével meghatározható az élő, a nekrotikus (propidium jodid pozitív) a korai apoptotikus (annexin-V pozitív), valamint a késői apoptotikus (annexin-V és propidium jodid pozitív) sejtek százalékos aránya.

A jelátviteli utak mérése flow citometriás módszerrel

A kezelést követően, a sejteket primér antitesttel, mint ERK1/2 (1:100), p38 MAPK (1:50), JNK1/2 (1:50), aktív kaszpáz-3 (1:100), Bcl-2 (1:50), foszfo-Bad (1:100), foszfo-PKA (1:100), Bcl-xL (1:50), 14-3-3 fehérje (1:50), foszfo-Akt (1:50), majd FITC

konjugált szekunder anti-egér, vagy anti-nyúl IgG antitesttel (1:50) jelölt sejteket áramlási citométerrel mértük.

II.6.3. A PACAP hatásának vizsgálata trophoblast sejtek túlélésére és jelátviteli útvonalaira

A trophoblast sejtek humán JAR choriocarcinoma sejtvonalból származtak. A sejteket a következő kezeléseknek tettük ki: 9 órás 0,45 vagy 0,9mM H₂O₂, 75μM CoCl₂ (*in vitro* hypoxia, Nowak et al., 2007), 1μg/ml lipopoliszacharid (LPS), vagy 200mM ethanol. Minden csoportban a PACAP-kezelést 1 órás 100nM PACAP-pal végeztük. A sejtek túlélését MTT teszttel vizsgáltuk (II.6.2.b. fejezet). Western blottal a következő fehérjék expresszióját vizsgáltuk a II.5.1.b. fejezetben leírtak szerint: Akt, foszfo-Akt, foszfo-ERK, foszfo-JNK, foszfo-p38 MAPK, 9 órás 0,6mM H₂O₂ kezelés és 1 órás 100nM PACAP előkezelés után. Egy külön csoportban vizsgáltuk a PACAP6-38 hatását: a sejteket 1 órán keresztül kezeltük 100nM PACAP1-38-cal, vagy 1μM PACAP6-38-cal, vagy mindkét peptidet alkalmazva.

II.6.4. A PACAP antiapoptotikus hatása *Helix pomatia* nyálmirigyében

Kísérleteinkben a kifejlett *Helix pomatia* egyedeinek nyálmirigyt használtuk fel. Fiziológias sóoldatban való mosás után az apoptózist dopaminnal és colchicinnel indukáltuk (10⁻⁴M) (Pirger et al., 2009). A PACAP-ot ebben az esetben magas koncentrációban alkalmaztuk a mirigyben lévő peptidáz enzimek miatt (10⁻⁴M, 15 perces előkezelés). A nyálmirigy apoptotikus folyamatainak megjelenítéséhez TACS-XL – DAB *in situ* apoptózis detektáló kitet, valamint kaszpáz-3 immunjelölést használtunk. A TUNEL pozitív (apoptotikus) sejtek számát az egyes állatok nyálmirigyéből (n=6-8) kriosztát metszetek három területének (1,8 mm² területet használtunk 400-as nagyításnál) átlagaként határoztuk meg.

II.7. Statisztikai analízis

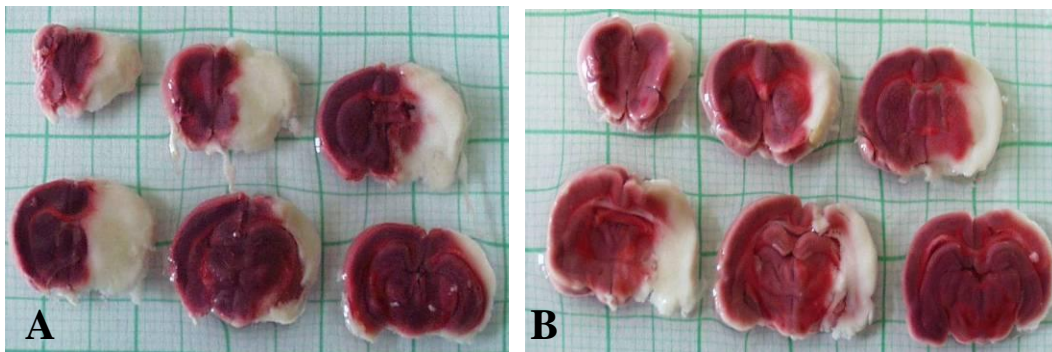
A statisztikai elemzéshez az SPSS, Microsoft Excel és GraphPrism szoftvereket használtuk. Két csoport összehasonlításánál a legtöbb esetben Student-*t* próbát végeztünk. Több csoport összehasonlításánál ANOVA tesztet használtunk, amit Tukey-B vagy

Neuman-Keul *post hoc* analízis követett. A magatartási jelek javulását Friedman féle teszttel végeztük, a korrelációt az infarktus nagysága és a neurológiai jelek között Spearman korrelációs analízissel vizsgáltuk, a súly és az infarktus nagysága között pedig Pearson-féle korrelációs analízist végeztünk. A magatartási tesztekben a nonparametrikus adatokat nonparametrikus Mann Whitney teszttel analizáltuk. Szignifikancia szintként a $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) vagy $P < 0,001$ (***) értékeket határoztuk meg.

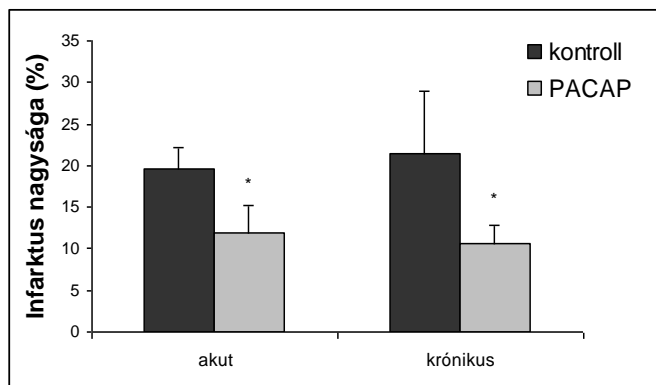
III.1. STROKE MODELLEN VÉGZETT KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEI

III.1.1. PACAP hatása permanens ischaemiában

Kísérletünk első felében az állatokat 12 órával az MCAO után dolgoztuk fel. Alacsony dózisu (250 és 500 ng) preischaemiás icv PACAP kezelés nem bizonyult hatásosnak, az infarktus nagysága $15,9 \pm 3,4\%$ illetve $14,8 \pm 3\%$ volt a teljes agyterületnek, ami nem tért el szignifikánsan a kontroll csoportnál mért $14,8 \pm 7,2\%$ -tól. Ezzel szemben a $2\mu\text{g}$ PACAP-pal kezelt csoportban a műtét előtt beadott PACAP szignifikánsan csökkentette az infarktus nagyságát ($5,8 \pm 3,2\%$, $P < 0,05$). Ez a védő hatás az infarktus végső nagyságában is megmutatkozott, 24 órával az MCAO után (**III.1.1. és 1.2. ábrák**). Ezen vizsgálatok után a preventív kezelés kivitelezésére került sor. Az állatokat 7 napon keresztül kezeltük icv $2\mu\text{g}$ PACAP-pal, és az infarktus nagyságát 24 óra múlva vizsgáltuk. Kísérleteink során hasonló eredményt értünk el, mint az egyszeri dózissal, hiszen az infarktus nagysága $10,6 \pm 2,1\%$ -a volt az egész agyterületnek, ami nem különbözött szignifikánsan az egyszeri dózissal mért $10,25 \pm 5,3\%$ -os értéktől (**III.1.2. ábra**).

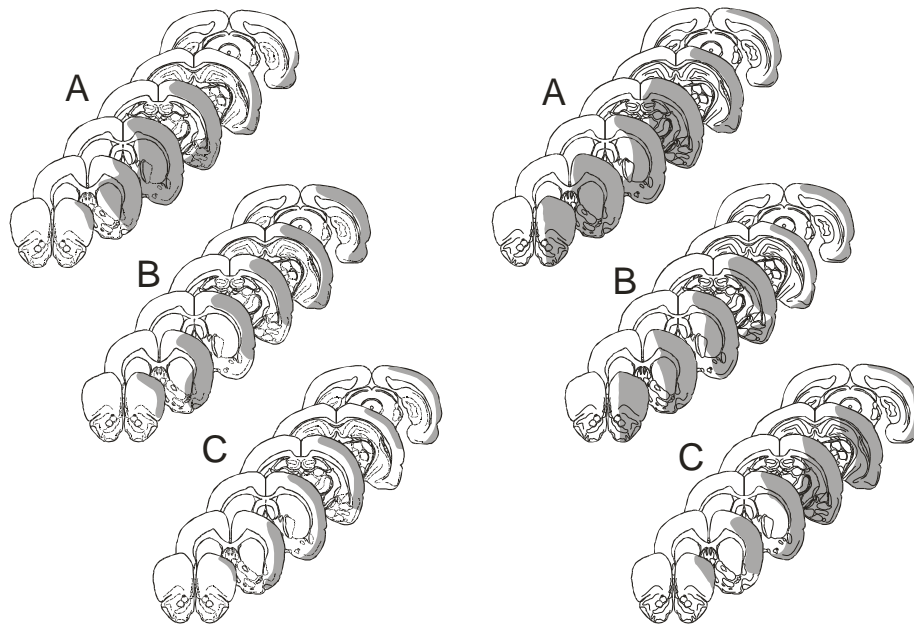


III.1.1. ábra. Reprezentatív agyszeletek egy kontroll (A) és egy icv $2\mu\text{g}$ PACAP-pal (B) kezelt állatból, TTC festés.



III.1.2. ábra. Infarktus nagysága a teljes agyterület százalékában kifejezve 24 órával az operációt követően $2\mu\text{g}$ PACAP egyszeri (akut) és ismételt (krónikus) beadását követően (átlag \pm SEM). * $P < 0,05$ vs kontroll csoport.

A 2 μ g PACAP kezelés hatékonyságát összehasonlítottuk ugyanilyen dózisú VIP hatékonyságával. Eredményeink azt mutatták, hogy az alkalmazott VIP dózis nem volt hatékony, az infarktus területe $15,2\pm7,3\%$ volt 12 óra múlva, és $20,6\pm4,6\%$ 24 óra múlva, ami nem különbözött a kontroll csoportban mért $14,8\pm7,2\%$, illetve $21,5\pm9,4\%$ -tól (**III.1.3. ábra**).

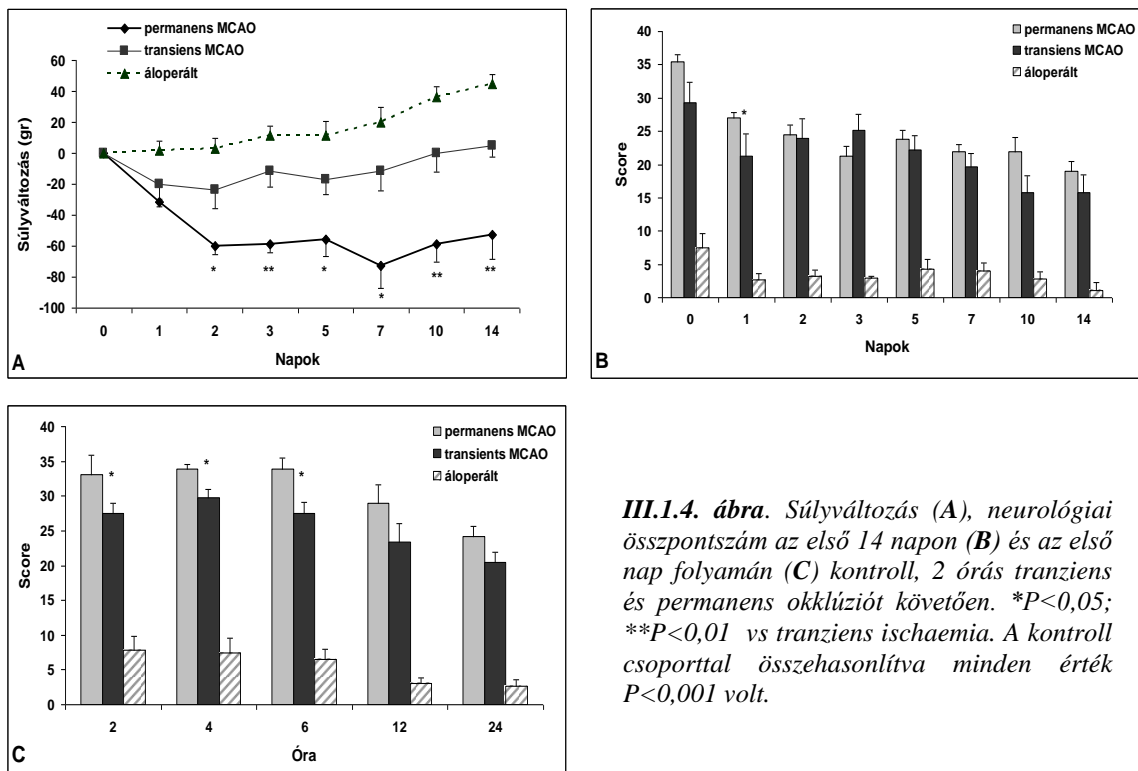


III.1.3. ábra. Az ábrák egy reprezentatív kontroll állat (A), egy preventív VIP (B) és PACAP kezelésben részesült állat (C) ischaemiás károsodását (szürke terület) mutatják különböző coronalis metszeteken 12 (bal oldali tábla) és 24 órával (jobb oldali tábla) az okklúzió után.

III.1.2. Funkcionális deficit értékelése MCAO után

Az állatok testsúlya a permanens MCAO után drasztikus csökkenést mutatott, a tranzienis okklúzió esetén a súly nem változott, míg áloperáltakban folyamatosan nőtt (**III.1.4.A. ábra**). Az érlelt állatok súlya minden időpontban alacsonyabb volt, mint az áloperáltaké, azonban az infarktus nagysága és a súly között csak a permanens lekötés esetén volt korreláció. Egy 16 pontból álló teszt skála segítségével értékeltük az állatok funkcionális teljesítményét 14 napon keresztül permanens és tranzienis ischémiát követően. Azt találtuk, hogy az összpontszám igen magas volt az érelzárást követő első napokban, majd folyamatosan csökkent, de az állatok nem mutattak nagymértékű javulást a 2. hét végére sem (**III.1.4.B. ábra**). Korrelációt az infarktus nagysága és a neurológiai jelek között csak a permanens okklúzió esetén találtunk a 7. és 10. napon. Míg az

infarktus nagyságában a korábbiakhoz hasonlóan különbséget találtunk a tranziens és permanens okklúzió között, ezt a nagyfokú különbséget a neurológiai jelek csak az első 6 órában reprezentálták (**III.1.4.C. ábra**). Mindebből arra következtettünk, hogy kezdeti teszteléshez, az első 6 órában megfelelő a tesztskála a károsodás mértékének megítéléséhez, azonban a későbbiek során a neuroprotektív szerek teszteléséhez ezek a leggyakrabban alkalmazott tesztek nem megfelelőek, mivel valószínűleg az infarktus magjának károsodását mutatják.

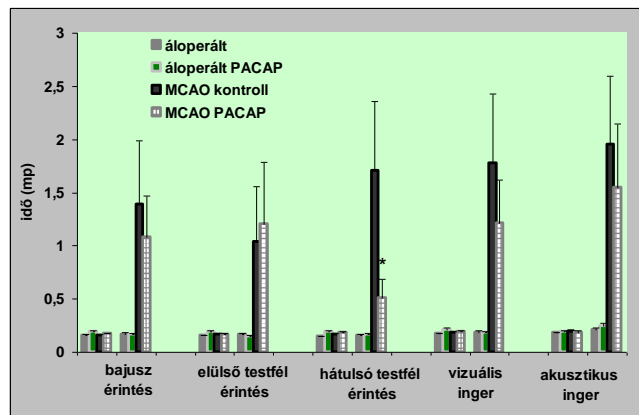


III.1.4. ábra. Súlyváltozás (A), neurológiai összpontszám az első 14 napon (B) és az első nap folyamán (C) kontroll, 2 órás tranziens és permanens okklúziót követően. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs tranziens ischaemia. A kontroll csoporttal összehasonlítva minden érték $P < 0,001$ volt.

III.1.3. PACAP hatása a funkcionális károsodásra

A 16 pontból álló neurológiai tesztskála értékelése nem mutatott különbséget a PACAP-pal kezelt és a kontroll csoport között egyik alkalmazott dózis esetén sem. Az icv preischaemiás PACAP kezelésben részesült állatok összpontszáma 12 óra múlva a következő volt a 0,25; 0,5; 1; és 2 μ g PACAP kezelések esetén: 28,0 \pm 1,6; 24,1 \pm 4,1; 23,3 \pm 2,3; 19,3 \pm 3,4. Ugyan a 2 μ g PACAP kezelésben részesült állatok érték el a legalacsonyabb pontszámot, ez nem különbözött szignifikánsan a kontroll ischaemiás csoportban mért 26,4 \pm 2,5 ponttól. Az okklúzió után 24 órával a pontszám 25,7 \pm 2,3 volt a kontroll csoportban, míg a 2 μ g PACAP-pal kezelt csoportban 25,2 \pm 2,1. Az okklúzió után

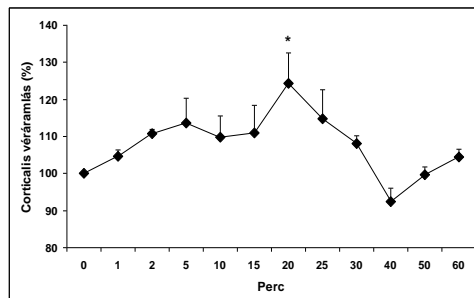
7 nappal pedig a pontszám $26,8 \pm 4,1$ volt a kontroll állatokban, a PACAP-pal kezelt állatokban pedig $29,7 \pm 2,4$. A finomabb tesztelésre alkalmas orientációs tesztben azonban a PACAP-pal kezelt állatok javulást mutattak. Az operáció előtt nem volt eltérés a csoportok között, az áloperált állatok értékei a műtét után sem változtak. Ezzel szemben MCAO után a kontralaterális oldalon mért reakcióidők szignifikánsan növekedtek mind a kontroll, mind a PACAP kezelt csoportoknál. A $2\mu\text{g}$ PACAP-pal kezelt állatok rövidebb idő alatt reagáltak a vizuális és akusztikus ingerekre, és szignifikánsan rövidebb idő alatt reagáltak a hátsó testrész érintésére, mint a kontroll állatok (**III.1.5. ábra**).



III.1.5. ábra. Az ábra a különböző orientációs tesztekben mért reakcióidőt jelöli másodpercben (átlag \pm SEM) az áloperált kontroll és PACAP-pal kezelt, valamint az a. cerebri media okklúzió átesett kontroll és PACAP-pal kezelt csoportokban. A bal oldali négyes oszlopok az operációt megelőző, a jobb oldaliak a műtét utáni értékeket mutatják. * $P < 0,05$ vs kontroll csoport.

III.1.4. PACAP hatásának vizsgálata a lokális kortikális keringésre

A kortikális keringést a PACAP icv beadását követően 11 időpontban mértük. Az agyi keringés a PACAP beadását követően emelkedett az első 15 percben, 20 perc múlva elérte a maximális értéket, amely szignifikánsan magasabb volt a kiindulási értéknél, majd fokozatosan visszatért az eredeti szintre. A kontroll állatok esetében nem észleltünk változást az agyi keringésben (**III.1.6. ábra**).



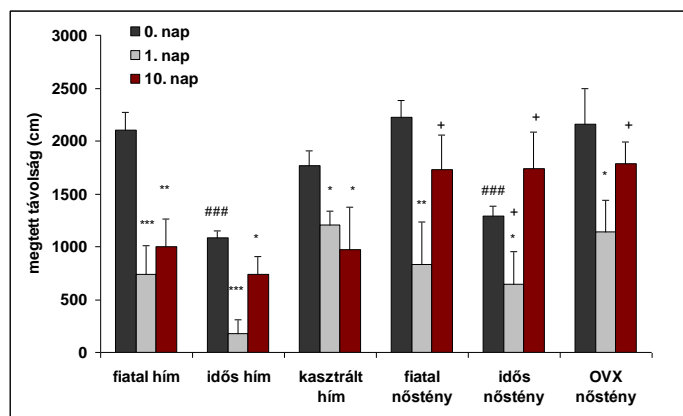
III.1.6. ábra. A grafikon a lokális agyi keringés változását mutatja icv PACAP kezelés után a kezelés előtt mért érték százalékában kifejezve (átlag \pm SEM). * $P < 0,05$ vs 0 perc.

III.2. NEURODEGENERATÍV BETEGSÉGEK ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEIN VÉGZETT KÍSÉRLETEK

III.2.1. A 6-OHDA-indukálta substantia nigra károsodás kor- és nemfüggésének vizsgálata

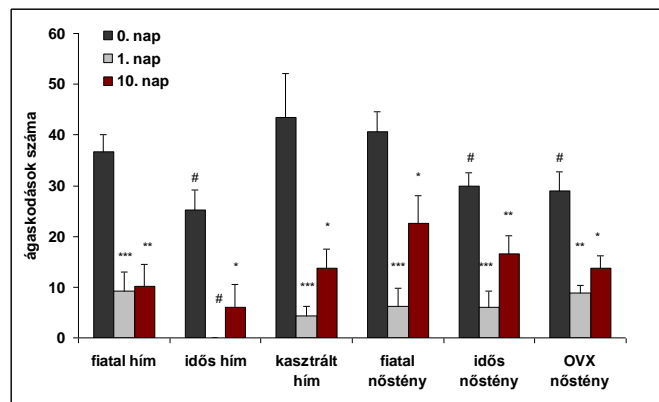
Lokomotoros aktivitás

Az alkalmazott Parkinson-kór modell eltérő hatásokat eredményezett fiatal és idős, valamint hím és nőstény patkányokban. A műtét előtti motoros aktivitás jelentősen alacsonyabb volt idős állatokban, mint fiatalokban, de nembeli különbséget nem figyeltünk meg. A substantia nigra léziót követő 1. napon a motoros aktivitás minden csoportban jelentősen csökkent (**III.2.1. ábra**). A hypokinesia legkifejezettebben az idős hímelekben jelentkezett, mely mind az aktivitási időben és a megtett távolságban, mind az ágaskodásban és a nyugalmi időben megmutatkozott. Kasztrált hímelekben kevésbé csökkent a motoros aktivitás, mint nem kasztráltakban, míg a nőstényeknél nem volt különbség. A léziót követő 10. napon csak a nőstény állatokban volt egyértelmű javulás a motoros aktivitásban: minden nőstény csoportban eltűnt a szignifikáns hypokinesia a kiindulási aktivitással összehasonlítva, míg a hímelek a 10. napon is jóval kevesebbet mozogtak (**III.2.1. ábra**). Hasonló eredményt kaptunk a többi aktivitási paraméter értékelésekor.



III.2.1. ábra. Megtett távolság az open-field tesztben a lézió előtt, 1 és 10 nappal a lézió után (átlag \pm SEM). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ vs 0. napi értékek ugyanabban a csoportban, # $P<0,05$; ### $P<0,001$ vs fiatal állatok ugyanabban az időben, + $P<0,05$ vs hím állatok ugyanabban a korcsoportban.

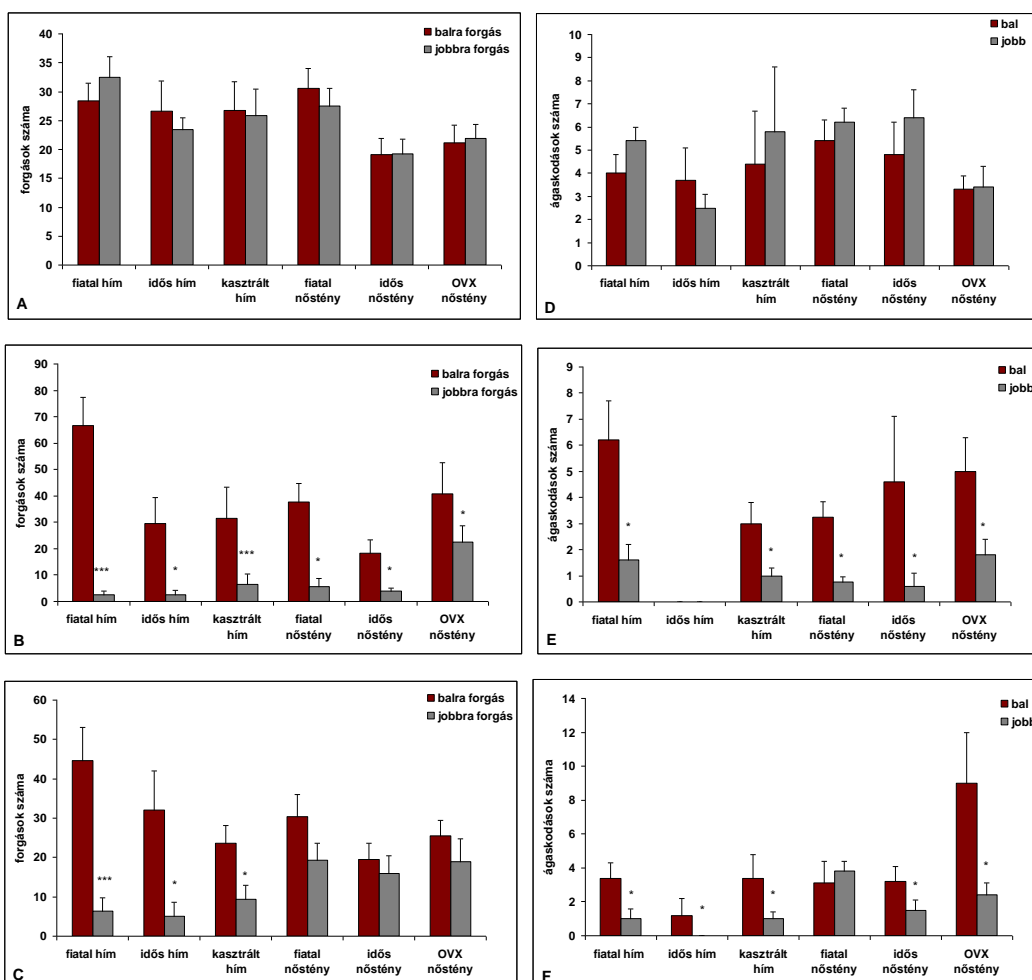
Az ágaskodó magatartás az idős állatokban jóval kevesebb volt a 0. napon, mint a fiatalokban. OVX állatok már kiinduláskor is kevesebbet ágaskodtak, mint a nem gonadektomizált nőstények. Egy nappal a lézió után az ágaskodó magatartás jelentősen csökkent minden csoportban. Az ágaskodás szinte értékelhetetlen volt idős hímek esetén, mivel gyakorlatilag nem mutatták ezt a mozgásformát. A fiatal hímek kivételével minden csoportban jelentős javulást észleltünk a 10. napon, de az ágaskodások száma nem érte el a kiindulási értéket egyik esetben sem (**III.2.2. ábra**).



III.2.2. ábra. Ágaskodások száma az open-field tesztben a lézió előtt, 1 és 10 nappal a lézió után (átlag±SEM). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs 0. napi értékek ugyanabban a csoportban, # $P < 0,05$ vs fiatal állatok ugyanabban az időben.

Aszimmetrikus jelek

A műtét előtt elvégzett teszt nem mutatott semmilyen oldalkülönbséget a forgások, az ágaskodáskor történő végtaghasználatban vagy az aszimmetrikus thigmotaxisban egyik csoportban sem (**III.2.3. ábra**). A léziót követő első napon igen jelentős aszimmetria lépett fel minden csoportban, legkifejezettebben a forgásokban. A 10. napra a nőstény állatok szignifikánsan jobban javultak. A fiatal és idős hím állatok 10 nappal a lézió után is balra mutató forgási, ágaskodási és thigmotaxist mutattak. A fiatal nőstényeknél az aszimmetria minden jelben eltűnt 10 nappal a léziót követően. Idős és OVX nőstényeknél 10 nappal a műtét után megszűnt a forgási aszimmetria, de az ágaskodási és thigmotaxisban megfigyelt aszimmetria megmaradt (**III.2.3. ábra**).



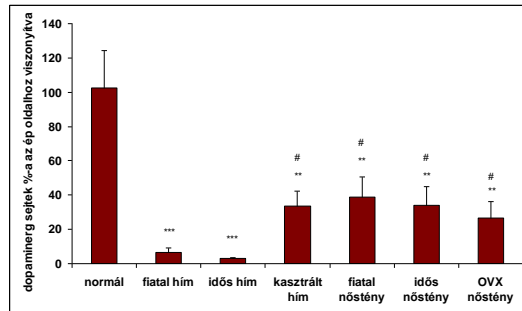
III.2.3. ábra. Bal és jobbra irányuló forgás (A,B,C) és ágaskodás (D,E,F) (átlag±SEM) a műtét előtt (A,D), 1 (B,E) és 10 (C,F) nappal a lézió után. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs balra irányuló aktivitás.

Szövettani analízis

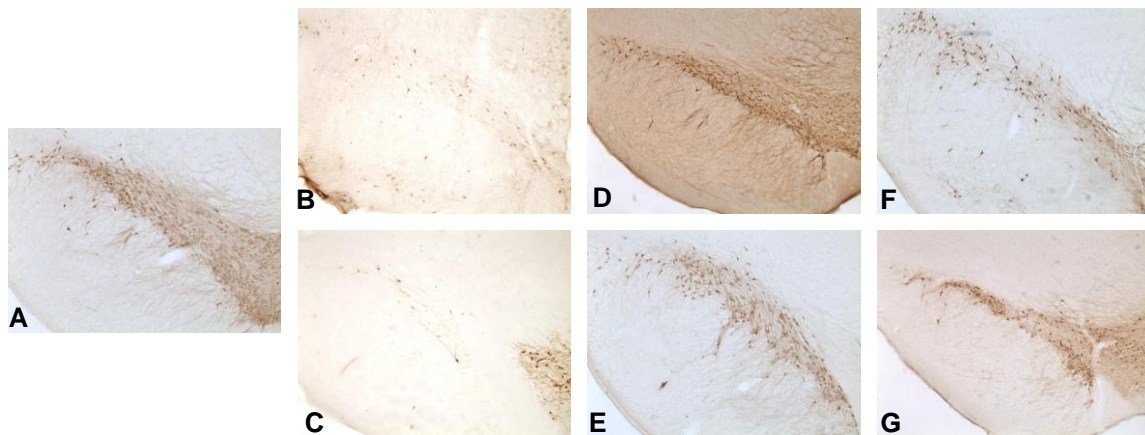
A szövettani analízis igazolta a magatartási megfigyeléseket. A hímekben több, mint 90%-os sejtpusztulást tapasztaltunk az ép oldali substantia nigrához viszonyítva, ami az idős hímekben valamivel nagyobb mértékű volt. A nőstényekben a sejtpusztulás csak 50-60% volt, az idős nőstényekben 10%-al több mint a fiatalokban, de ez a különbség sem volt szignifikáns. A kasztrált hímeknél a nőstényekhez hasonló mértékű sejtpusztulást figyelhettünk meg. (III.2.4. és 5. ábrák).

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a hím állatok érzékenyebben reagálnak a 6-OHDA által előidézett lézióra, mint a nőstények, ami mind a magatartási jelekben, mind a sejtpusztulás mértékében megmutatkozik. Az idős állatok súlyosabb magatartási jeleket

mutatnak ugyanolyan mértékű sejtpusztulás mellett, mint a fiatalok. A kasztrált hímek és az OVX nőstények a többi nőstényhez hasonló sejtpusztulást mutatnak, de a magatartási jelek súlyosabbak.



III.2.4. ábra. Dopaminerg (TH-pozitív) sejtek %-a (átlag \pm SEM) az ép oldalhoz viszonyítva a bal substantia nigra pars compactában. ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ vs normál állatok, # $P<0,05$ vs fiatal hímek.

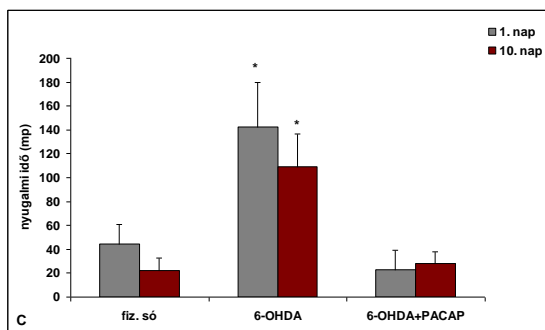
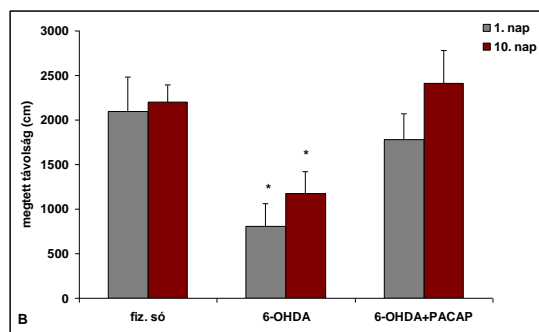
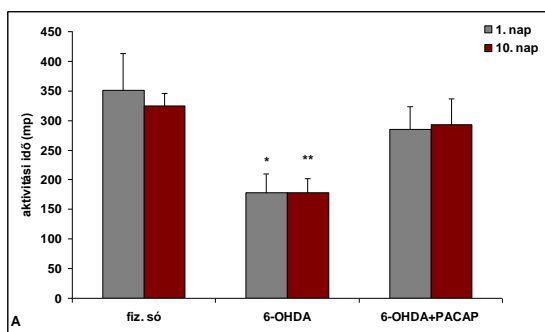


III.2.5. ábra. Normál állat (A) és 6-OHDA lézió utáni állatok reprezentatív TH-immunjelölt metszetei a léziós oldali (bal) substantia nigra pars compactából. (B) Fiatal hím, (C) öreg hím, (D) kasztrált hím, (E) fiatal nőstény, (F) öreg nőstény, (G) OVX nőstény.

III.2.2. A PACAP hatása fiatal hím patkányokban

Lokomotoros aktivitás

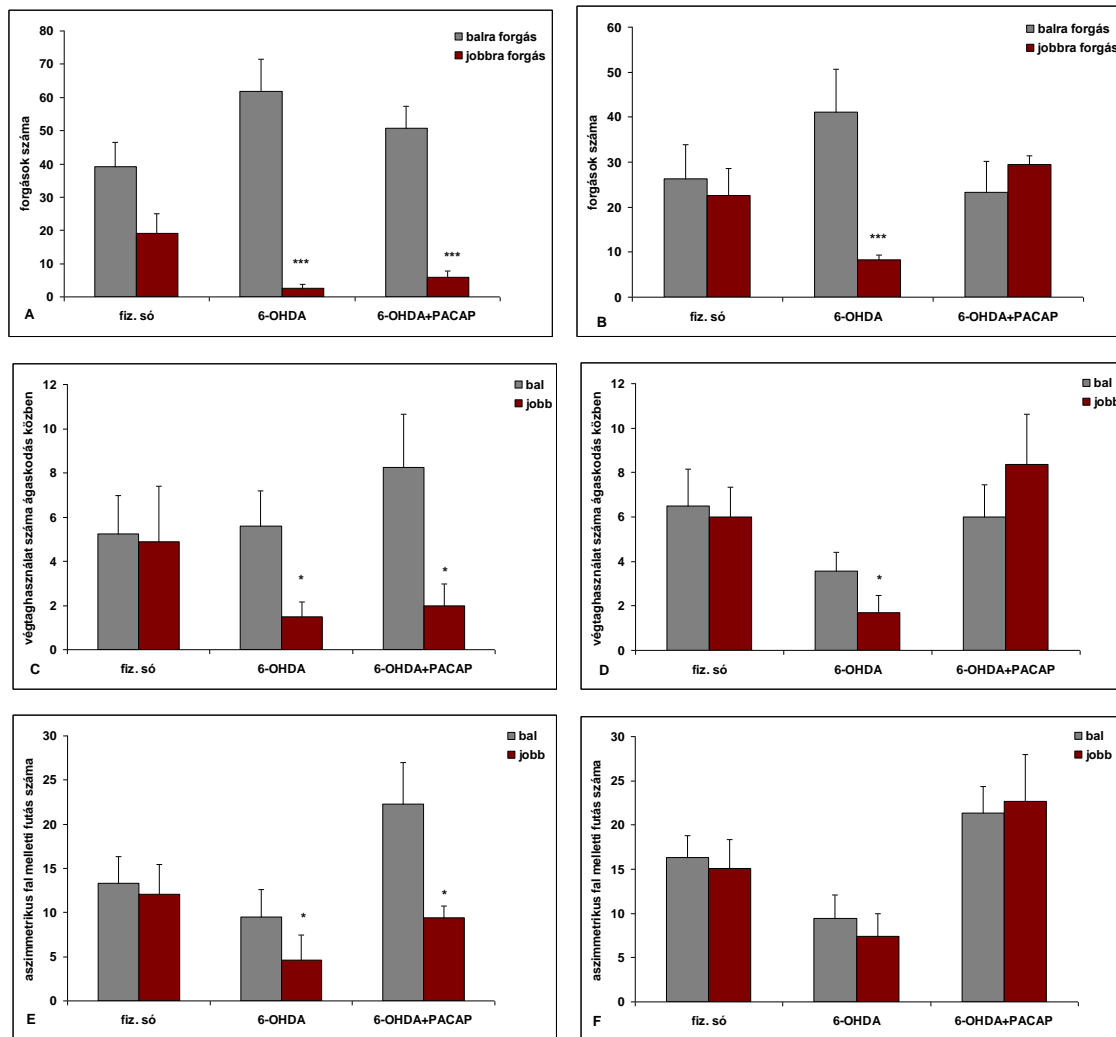
A PACAP előkezelés jelentősen javította a tüneteket, és csökkentette a dopaminerg sejtek pusztulásának mértékét fiatal hím állatokban. Legjobb eredményt a 0,1 μ g PACAP-pal kezelt csoportban tapasztaltunk. A mozgással eltöltött idő jelentősen csökkent a féloldali substantia nigra léziót követő első napon a kontroll csoportban, azonban a 0,1 μ g PACAP-pal kezelt állatoknál nem volt jelentősebb hypokinesia. A különbség a 10. napon is megmaradt, a kontroll állatok nem mutattak javulást az aktivitásban, illetve a megtett távolság tekintetében. Hasonló eredményt mutatott a nyugalomban eltöltött idő is: a kontrollcsoportokhoz képest a PACAP-pal kezelt csoport mind az 1., mind a 10. napon a csak sóoldat-kezelt állatokhoz hasonlóan kevés időt töltött teljes nyugalomban (**III.2.6. ábra**).



III.2.6. ábra. Általános aktivitás (A), megtett távolság (B) és a nyugalmi idő (C) az open-field tesztben kontroll és PACAP-pal kezelt csoportokban 6-OHDA lézió után 1 és 10 nappal (átlag±SEM). * $P<0,05$; ** $P<0,01$ vs kontroll csoport.

Aszimmetrikus jelek

Az aszimmetrikus jelek mind a kontroll, mind a PACAP-pal kezelt csoportban megjelentek a műtét után 1 nappal. Legkifejezettebb aszimmetriát a forgásban találtunk: míg a csak sóoldattal kezelt állatok a vártak megfelelően megközelítőleg 50%-os arányban forogtak a bal, illetve a jobb oldalra, addig a substantia nigra roncsolt állatok több mint 90%-os bal oldali aszimmetriát mutattak. Azonban amíg a kontroll csoportban a 10. nappal sem mutatkozott jelentős javulás, addig a PACAP kezelt állatokban az oldalkülönbség eltűnt a 10. nappal. Hasonló eredményt mutatott az aszimmetrikus támaszkodás vizsgálata is: az aszimmetrikus végtaghasználat eltűnt a PACAP-pal kezelt csoportban a 10. nappal, míg a kontrollok ugyan valamivel enyhébb, de még mindig aszimmetrikus végtaghasználatot mutattak. A kontroll és a PACAP-pal kezelt csoportban is az aszimmetrikus thigmotaxis, mely kifejezett volt még az 1. napon, megszűnt a 10. nappal (III.2.7. ábra).



III.2.7. ábra. Aszimmetrikus forgás (A,B), ágaskodás (C,D) és thigmotaxis (E,F) lézió nélküli, 6-OHDA kontroll és PACAP-pal kezelt állatokban 1 (A,C,E) és 10 (B,D,F) nappal a lézió után. Átlag±SEM. * $P<0,05$; *** $P<0,001$ vs ellenkező oldal.

Az apomorfín indukálta forgó mozgás vizsgálata

A fiziológiás sóoldattal kezelt állatoknál apomorfínnal nem tudtunk rotációs mozgást indukálni. A 6-OHDA-nal kezelt kontroll csoportban a forgások átlag mennyisége 30 perces megfigyelés alatt $186,5 \pm 33,4$ volt. A PACAP-pal kezelt csoportok egyedei szignifikánsan kevesebbet forogtak, a forgások átlag száma $17,06 \pm 6,9$ volt ($P<0,001$).

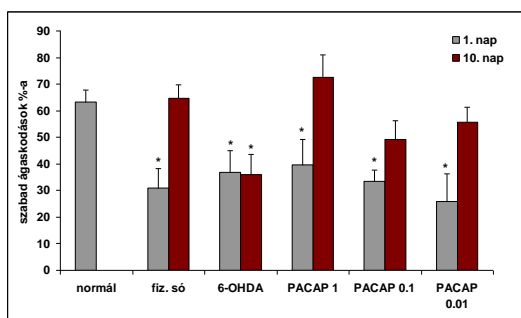
Szövettani analízis

A magatartási vizsgálatkor kapott eredményt, miszerint a PACAP-pal kezelt csoportban a hypokinesia nem jelent meg, és az aszimmetrikus jelek megszűntek a műtétet követő 10.

napon, a szövettani analízis is alátámasztotta. A dopaminerg sejtek pusztulása több mint 95%-os volt a kontroll csoport bal substantia nigrában a jobb oldalhoz hasonlítva ($2,47 \pm 1,33\%$ az ép oldalhoz képest). Ezzel szemben a PACAP-pal kezelt állatokban mindössze 50%-os sejtpusztulást tapasztaltunk, mely egyben csaknem 50%-os javulást is jelent ($50,33 \pm 4,96\%$, $P < 0,001$ vs 6-OHDA-kezelt).

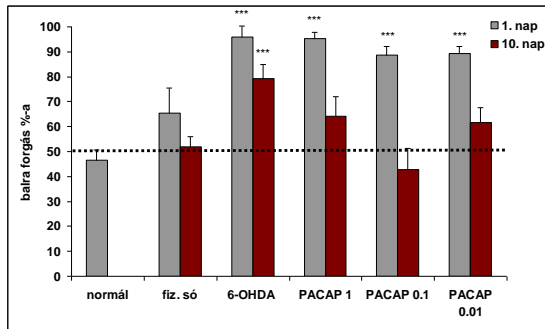
A PACAP hatásának dóziszfüggése

A fent leírt $0,1 \mu\text{g}$ dózissal kisebb és nagyobb dózisú PACAP kezelés ($0,01 \mu\text{g}$ és $1 \mu\text{g}$) ugyancsak neuroprotektívnek bizonyult. A motoros aktivitás mértéke csak az $1 \mu\text{g}$ PACAP-pal kezelt csoportban mutatott enyhe hypokinesziát. Az ezzel a dózissal kezelt állatok 1 nappal a műtét után kisebb távolságot tettek meg és kevesebbet ágaskodtak. A totál nyugalmi idő ugyancsak megnövekedett 1 és 10 nappal a műtét után, hasonlóan a 6-OHDA-kezelt kontroll csoporthoz. Az aktivitással eltöltött idő azonban nem mutatott szignifikáns csökkenést a kiindulási értékhez képest, és a legtöbb jelben a 10. napra javulás mutatkozott a léziós csoporttal ellentétben. Az aktivitási paraméterek egyébként teljesen hasonlóak voltak a **III.2.6. ábrán** ábrázoltakkal. Ezenkívül jól jelzi a motoros aktivitást a szabad ágaskodások száma is, azaz amikor az állat végtagtámasztás nélkül ágaskodik. Ez a paraméter minden kezelt csoportban (még a fiziológiás sóoldattal kezelt csoportban is) csökkenést mutatott 1 nappal a műtét után, azonban az összes PACAP-pal kezelt csoportban a kiindulási értékre tért vissza 10 nappal a műtét után (**III.2.8. ábra**).



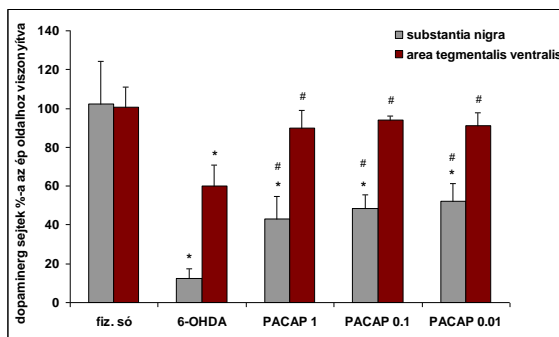
III.2.8. ábra. Szabad ágaskodások százaléka az össz ágaskodáshoz viszonyítva normál, fiziológiás sóoldattal, 6-OHDA-nal és különböző dózisú (1, 0,1 és 0,01 μg) PACAP-pal kezelt állatokban 1 és 10 nappal a műtét után (átlag \pm SEM). * $P < 0,05$ vs normál állatok.

Az aszimmetrikus jelek is hasonlóak voltak mindhárom PACAP-pal kezelt csoportban: a balra történő forgási tendencia (**III.2.9. ábra**), a bal oldallal történt kitámasztás ágaskodás közben, és a bal oldali thigmotaxis is megszűnt 10 nappal a műtét után, ellentétben a kontroll csoporttal.

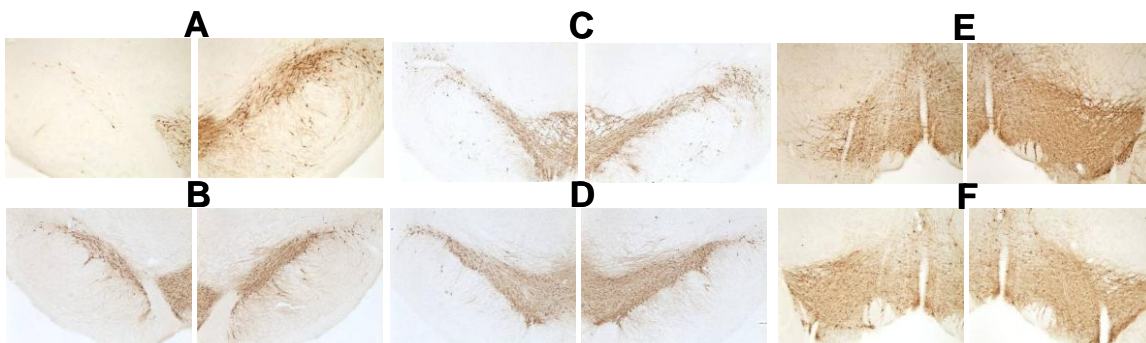


III.2.9. ábra. Balra forgás %-a az össz forgáshoz viszonyítva normál, fiziológiás sóoldattal, 6-OHDA-nal és különböző dózisú (1, 0,1 és 0,01 μ g) PACAP-pal kezelt állatokban 1 és 10 nappal a műtét után (átlag \pm SEM). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ vs normál állatok. A szaggatott vonal az ideális 50%-ot (szimmetrikus forgás) jelöli.

A dopaminerg sejtek száma a substantia nigra pars compactában (A 9-es sejtcsoport) és az area ventralis tegmentalisban (A 10-es sejtcsoport) igazolták a magatartási tesztek során tapasztalt javulást a PACAP-pal kezelt csoportokban (**III.2.10. és 11. ábrák**). A sejtszámok nem mutattak szignifikáns különbséget a dózis függvényében. Mindhárom csoportban a pars compactában a sejtpusztulás csak megközelítőleg 50%-os volt, míg a kontroll csoportban meghaladta a 90%-ot. A ventralis tegmentalis area-ban pedig nem tapasztaltunk jelentős sejtpusztulást a PACAP-pal kezelt csoportokban, míg a kontroll 6-OHDA-kezelt csoportban a dopaminerg sejtek közel 40%-a elpusztult (**III.2.10. és 11. ábrák**).



III.2.10. ábra. TH-pozitív dopaminerg sejtek %-a a sérült oldalhoz viszonyítva fiziológiás sóoldattal, 6-OHDA-nal és különböző dózisú (1, 0,1 és 0,01 μ g) PACAP-pal kezelt állatokban a substantia nigra pars compactában és a ventralis tegmentalis areában (átlag \pm SEM). * $P < 0,05$ vs normál állatok; # $P < 0,05$ vs 6-OHDA-kezelt állatok.



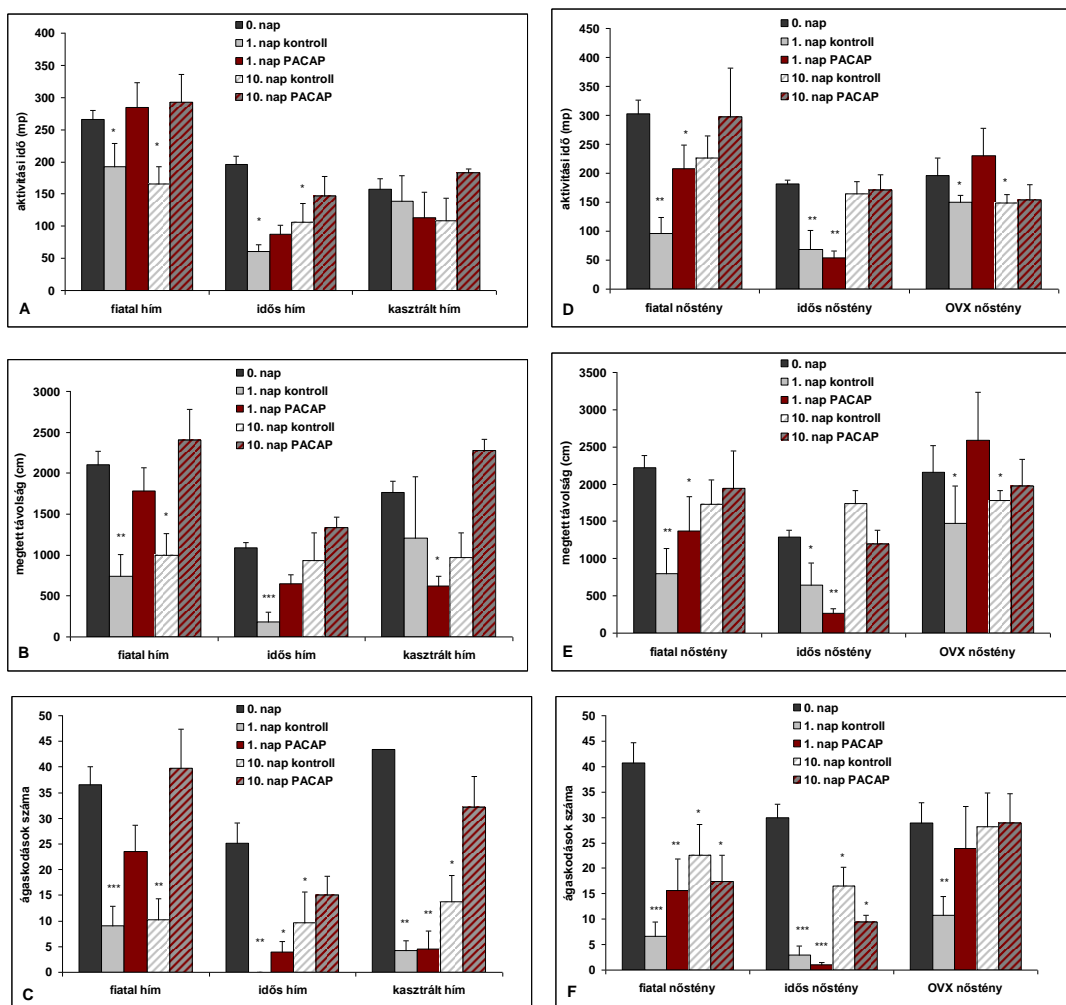
III.2.11. ábra. TH immunreaktivitás reprezentatív 6-OHDA kontroll és PACAP-kezelt állatokban. A bal oldali képek a léziós (bal) oldalt, a jobb oldali képek az ép (jobb) oldalt mutatják. (A) kontroll 6-OHDA, (B) 1 μ g, (C) 0,1 μ g, (D) 0,01 μ g PACAP-pal kezelt állatok substantia nigra pars compacta. (E) kontroll 6-OHDA kezelt, (F) 0,1 μ g PACAP-al kezelt állat area ventralis tegmentalis.

III.2.3. A PACAP hatásának vizsgálata a kor és nem függvényében

Lokomotoros aktivitás

A korábbi megfigyelésekkel összhangban, a motoros aktivitás jelentősen csökkent fiatal és idős hímekben egyaránt 1 nappal a léziót követően, és ez nem mutatott szignifikáns javulást 10 nappal később. A PACAP protektív hatása idős állatokon is megfigyelhető volt. Ellentétben a fiatal hímekkel, ahol a PACAP-pal kezelt állatokban akut hypokinesia sem volt, az idős állatokban akutan ugyan jelentkezett hypokinesia, de ez javult a 10. napra. Ez a többi aktivitási jelben is mutatkozott. A kasztrált állatok már a műtét előtt is kevesebbet mozogtak az intakt hímeknél, de ez nem csökkent tovább a lézió után. Csupán az ágaskodások száma csökkent jelentős mértékben a műtétet követően. A PACAP hatására a megtett távolság és az ágaskodások száma az akut hypokinesiót követően szignifikáns javulást mutatott a 10. napra kasztrált állatokban (**III.2.12. ábra**)

Nőstényeknél más tendenciát figyelhattunk meg. A horizontális és vertikális aktivitás minden csoportban csökkent 1 nappal a műtét után, kivéve az OVX PACAP-pal kezelt csoportot. Az értékek emelkedtek a 10. napra, kivéve az OVX állatokat, ahol az aktivitási idő és a megtett távolság 10 nappal a műtét után is kisebb volt, mint a kontroll érték. Idős nőstények minden aktivitási paramétere alacsonyabb volt a fiatalokénál. A PACAP az akut tüneteket javította a fiatal nőstényekben, de a különbségek a kontroll állatokban tapasztalt javulás miatt a 10. napra eltűntek (**III.2.12. ábra**).



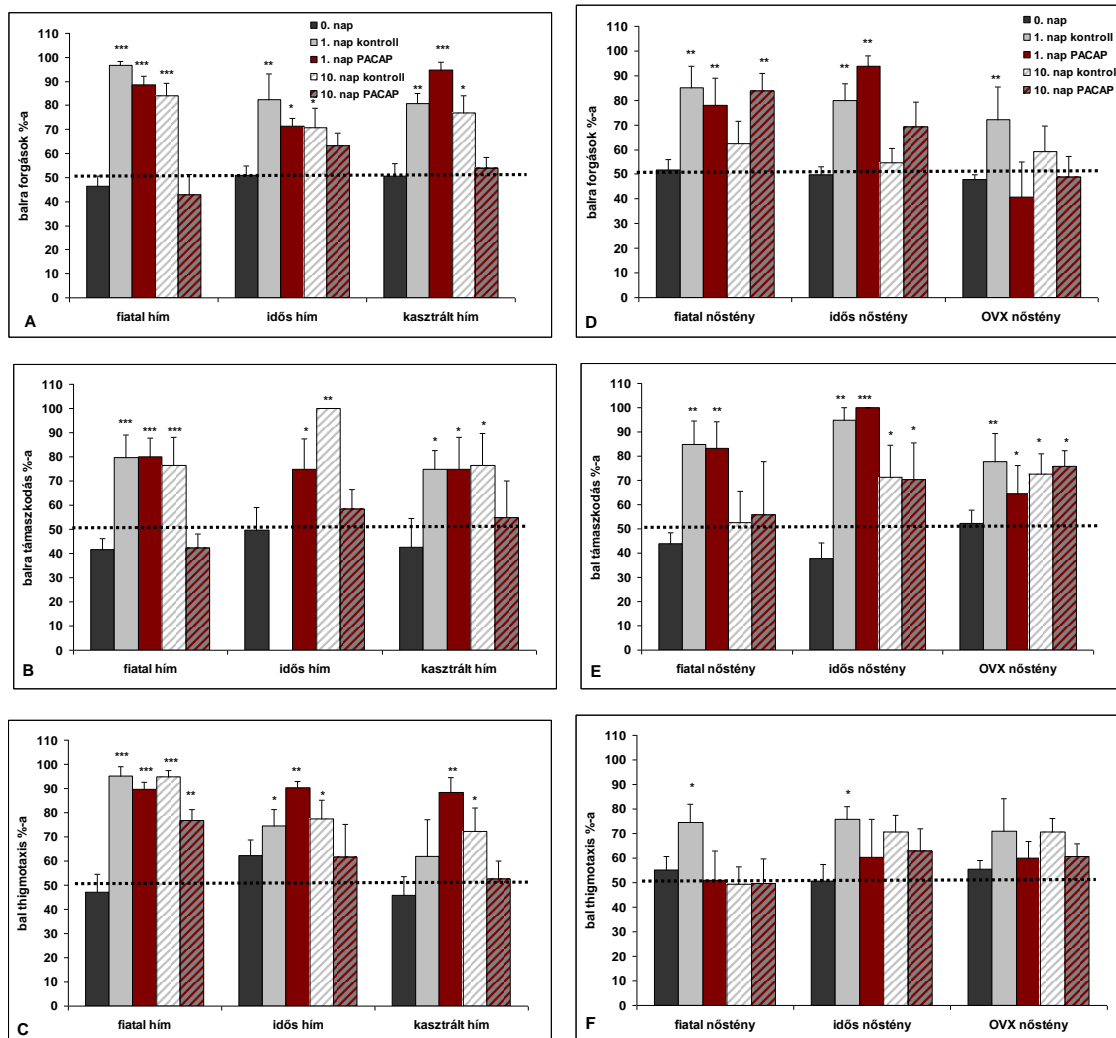
III.2.12. ábra. Általános aktivitás (A,D), megtett távolság (B,E) és ágaskodások száma (C,F) kontroll és PACAP-pal kezelt hím (A,B,C) és nőstény (D,E,F) állatokban a lézió előtt (0. nap), 1 és 10 nappal a lézió után (átlag±SEM). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ vs 0. nap.

Aszimmetrikus jelek

Egyik csoportban sem volt aszimmetria a műtét megelőzően (0. nap). Egy nappal a lézió után minden hím csoportban jelentkezett aszimmetria, kivéve a kasztrált állatok thigmotaxisát, ahol csak enyhe bal tendencia volt. Az idős hímeknél az ágaskodás értékelhetetlen volt 1 nappal a műtét után, mivel egyáltalán nem mutatták ezt az aktivitást. A lézió után 10 nappal a kontroll csoportokban az aszimmetria minden értéknél kifejezett maradt. PACAP hatására a 10. npra jelentős javulást figyelhettünk meg. Az aszimmetrikus jelek eltűntek, csak az aszimmetrikus thigmotaxis maradt meg a fiatal hímeknél, de kisebb arányban, mint a kontroll csoportban (III.2.13. ábra).

Nőstényeknél hasonló korai tendenciát figyelhattunk meg. Az aszimmetrikus forgás, ágaskodás és thigmotaxis kifejezett volt 1 nappal a lézió után mind a kontroll, mind a PACAP-pal kezelt csoportokban. Kivételt képezett a PACAP-pal kezelt fiatal nőstények thigmotaxisa, mely akutan sem mutatott aszimmetriát. 10 nappal a műtét után azonban a nőstényeknél jelentős javulás mutatkozott. A balra forgás aszimmetriája teljesen eltűnt a kontroll csoportokban, csupán a PACAP-pal kezelt fiatal és idős nőstények mutattak enyhe forgási tendenciát. A támaszkodási aszimmetria leginkább a fiatal nőstényekben szűnt meg, az idősek és az OVX állatok még mutatták ezt a jelet mind a kontroll, mind a PACAP-pal kezelt csoportokban. A thigmotaxis is legjobban a fiatal nőstényekben javult, időseknél és OVX-nál csak a PACAP-pal kezelt csoportokban **(III.2.13. ábra)**.

A magatartási jeleket összegezve elmondhatjuk, hogy a hímeknél a PACAP egyértelműen javítja a magatartási tüneteket, mind a hypokinesiót, mind az aszimmetrikus jeleket. Legjobb hatást a fiatal hímekben találtuk, ahol akutan sem jelentkezett szignifikáns hypokinesia. Az idős hímekben és a kasztrált állatokban pedig a PACAP jelentősen javította a 10. napi jeleket, azaz a gyógyulás sokkal kifejezettebb volt. Az aszimmetrikus jelek a legtöbb hím PACAP-pal kezelt állatban a 10. napra megszűntek. Nőstényeknél nem volt ennyire egyértelmű a PACAP hatása. Akutan csak az OVX állatokban csökkentette a hypokinesiót, a hímekhez hasonlóan. Az aktivitási jelek gyógyulását a kezelés nem befolyásolta. Az aszimmetrikus jelekben pedig a nőstényeknél megfigyelhető spontán gyógyulást nem befolyásolta a kezelés jelentős mértékben.

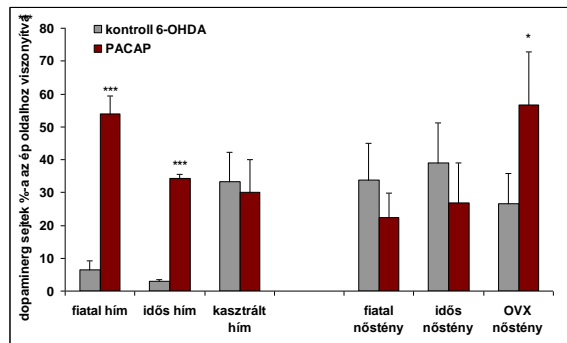


III.2.13. ábra. Aszimmetrikus forgás (A,D), támaszkodás (B,E) és thigmotaxis (C,F) kontroll és PACAP-pal kezelt hím (A,B,C) és nőstény (D,E,F) állatokban a műtét előtt (0. nap), 1 és 10 nappal a lézió után a balra mutató tünetek az összes forgás, támaszkodás, illetve thigmotaxis %-ában megadva (átlag±SEM). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ vs 0. nap. A szaggatott vonal az ideális 50%-ot (szimmetrikus jelek) jelöli. Az oszlopok minden ábrán ugyanazokat a csoportokat jelölik, mint az A,D ábrákon.

Szövettani analízis

A TH immunhisztokémiai analízis azt mutatta, hogy léziót követően a dopaminerg sejtek száma legjobban a fiatal és idős hímekben csökkent. Ezekben az állatokban több mint 95%-os sejtpusztulást tapasztaltunk az ép oldali substantia nigrával összehasonlítva. Ezt a PACAP mindkét csoportban jelentősen javította, legjobban a fiatal hímeknél, ahol a sejtpusztulás 50%-os volt, míg időseknél ez megközelítőleg 65% volt. Kasztrált hímeknél a sejtpusztulás nem volt ennyire kifejezett, csupán 70% körüli volt, amin a PACAP

kezelés nem változtatott. Fiatal és idős nőstényeknél a kasztrált hímekhez hasonló sejtpusztulást tapasztaltunk, és ebben az esetben sem volt a PACAP-nak szignifikáns hatása. OVX nőstényeknél a sejtpusztulás nagyobb mértékű volt, azonban nem érte el a hímekhez hasonló értéket. Ebben az esetben pedig a PACAP kezelés szignifikáns javulást eredményezett, a TH-pozitív sejtek száma közel duplája volt a kontroll OVX állatokénak (**III.2.14. ábra**).



III.2.14. ábra. Dopaminerg sejtek (TH-pozitív) százaléka a roncsolt oldali substantia nigra pars compactában kontroll 6-OHDA és PACAP-kezelt állatokban. Az ép oldalihoz viszonyítva a sejtszám minden esetben szignifikáns volt ($P < 0,001$, nincs külön jelölve). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ vs kontroll csoport.

III.2.4. A PACAP hatása Huntington-chorea modellben

Lokomotoros aktivitás

A motoros aktivitás vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a quinolinsav léziós állatok hyperkinetikusak voltak 1 nappal az operációt követően a normál állatokhoz képest, de a mozgással töltött idő a 10. nappra lecsökkent. A 2 μ g PACAP-pal kezelt állatok szintén szignifikánsan többet mozogtak, mint a normál állatok 1 és 10 nappal az operáció után. Ezzel szemben a 0,2 μ g PACAP-pal kezelt állatok egyik vizsgált időpontban sem voltak hyperkinetikusak. A motoros aktivitás vizsgálata során számoltuk az összes forgás számát is. Nem volt szignifikáns különbség a forgások számát tekintve a normál állatok és a 0,2 μ g PACAP-pal kezelt állatok között egyik vizsgált időpontban sem, szemben a többi csoporttal, ahol minden állat szignifikánsan többet forgott 1 nappal a műtét után, mint a normál állatok (**III.2.1. táblázat**).

III.2.1. táblázat. A kontroll quinolinsavval, és a lézió mellett 0,2 valamint 2µg PACAP-pal kezelt állatok mozgással töltött ideje és forgásainak száma (átlag±SEM) a lézió előtt (0. nap), 1, 10 és 30 nappal a léziót követően. *P<0,05 vs 0. nap.

	0. nap		Kontroll	PACAP 0,2 µg	PACAP 2 µg
Aktivitási idő (mp)	162 ± 86	1. nap	231,4 ± 30,1*	149,2 ± 21,5	248,5 ± 34,3*
		10. nap	176,0 ± 7,8	159,0 ± 14,5	282,2 ± 27,6*
		30. nap	192,5 ± 27,6	182,0 ± 18,8	192,4 ± 17,0
Forgás (db)	91 ± 7,2	1. nap	171,4 ± 41,1*	129,1 ± 26,5	184,5 ± 26,0*
		10. nap	106,2 ± 8,6	119,7 ± 10,8	110,4 ± 17,9
		30. nap	92,1 ± 15,4	107,1 ± 11,7	101,4 ± 9,5

Aszimmetrikus jelek

A forgási aszimmetria rendkívül szembetűnő volt a quinolinsavval kezelt kontroll állatoknál és a 2µg PACAP-pal kezelt állatoknál 1 nappal az operációt követően, ami részlegesen javult a 10. napra, de további javulás nem mutatott. Ezzel szemben a 0,2µg PACAP-pal kezelt állatok az akut aszimmetria teljesen eltűnt a 10. napra (**III.2.2. táblázat**). A quinolinsavval kezelt kontroll állatok támaszkodó mozgásának vizsgálata során nagyfokú bal oldali aszimmetriát találtunk mind 1, mind 10 nappal a lézió után, ami a 30. napra enyhe javulást mutatott. A különböző dóziszú PACAP-pal kezelt állatok között nem találtunk szignifikáns különbséget, ezek az állatok a jobb mellső végtagjukat gyakrabban használták támaszkodás közben, így az aszimmetria jóval enyhébb volt már 1 nappal az operáció után (**III.2.2. táblázat**). Az előbbi aszimmetrikus jelhez hasonlóan a sérült állatok szignifikánsan nagyobb utat tettek meg bal oldalukkal a falnak támaszkodva, mint a normál állatok a vizsgálat teljes ideje alatt. Bár a 0,2µg PACAP-pal kezelt állatok is szignifikáns aszimmetriát mutattak, a bal oldal dominanciája mégsem volt annyira kifejezett, mint a többi csoportban (**III.2.2. táblázat**).

III.2.2. táblázat. A kontroll quinolinsavval, és a 0,2 valamint 2µg PACAP-pal kezelt léziós állatok aszimmetrikus forgó mozgása, aszimmetrikus ágaskodása, és aszimmetrikus fal melletti mozgása a bal oldalnak a jobb oldali%-ban kifejezve (átlag±SEM) az operáció előtt (0. nap), 1, 10 és 30 nappal a léziót követően. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 vs 0. nap.

	0. nap		Kontroll	PACAP 0,2 µg	PACAP 2 µg
Forgás	40,48 ± 6,4	1. nap	95,5 ± 2,2***	81,7 ± 4,6***	95,4 ± 2,4***
		10. nap	74,0 ± 5,0**	61,4 ± 6,6	66,4 ± 4,6**
		30. nap	72,3 ± 5,5**	57,1 ± 4,4	62,6 ± 3,4**
Ágaskodás	32,8 ± 8,9	1. nap	97,2 ± 2,7***	75,4 ± 12,2*	75,9 ± 12,12*
		10. nap	88,1 ± 3,8***	77,6 ± 8,4**	71,7 ± 7,6**
		30. nap	72,0 ± 10,4*	69 ± 7,2*	65,0 ± 4,7*
Thigmotaxis	45,6 ± 8,7	1. nap	80,3 ± 6,5**	65,4 ± 6,0*	81,9 ± 6,4**
		10. nap	81,7 ± 3,7**	72,8 ± 5,6*	75,9 ± 2,8**
		30. nap	77,5 ± 5,4**	76 ± 6,2*	78,0 ± 3,7**

Katalepszia teszt

A rigiditási jelek vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a kontroll léziós állatok és a 2µg PACAP-pal kezelt állatok szignifikánsan kevesebb időt töltöttek mozdulatlanul mindhárom tesztnél, mint a normál állatok. Azonban nem találtunk szignifikáns eltérést a 0,2µg PACAP-pal kezelt állatok és a normál állatok között a magas rúd tesztben, és az üveg tesztben: az állatok hosszú ideig képesek voltak megtartani abnormális helyzetüket (*III.2.3. táblázat*).

*III.2.3. táblázat. A kontroll quinolinsavval, és a lézió mellett 0,2 valamint 2µg PACAP-pal kezelt állatok mozdulatlansággal töltött ideje (mp) a 3 különböző katalepszia tesztben (átlag±SEM). *P<0,05 vs 0. nap.*

	0. nap	Kontroll	PACAP 0,2 µg	PACAP 2 µg
magas rúd	136,0±18,6	62,2 ± 16,3*	116,6 ± 17,8	47,7 ± 25,6*
alacsony rúd	180,2±12,5	93,8 ± 21,8*	116,3 ± 19,8*	103,6 ± 19,9*
üvegteszt	173,8±3,8	93,5 ± 20,3*	154,5 ± 23,3	113,4 ± 17,2

Szövetteni analízis

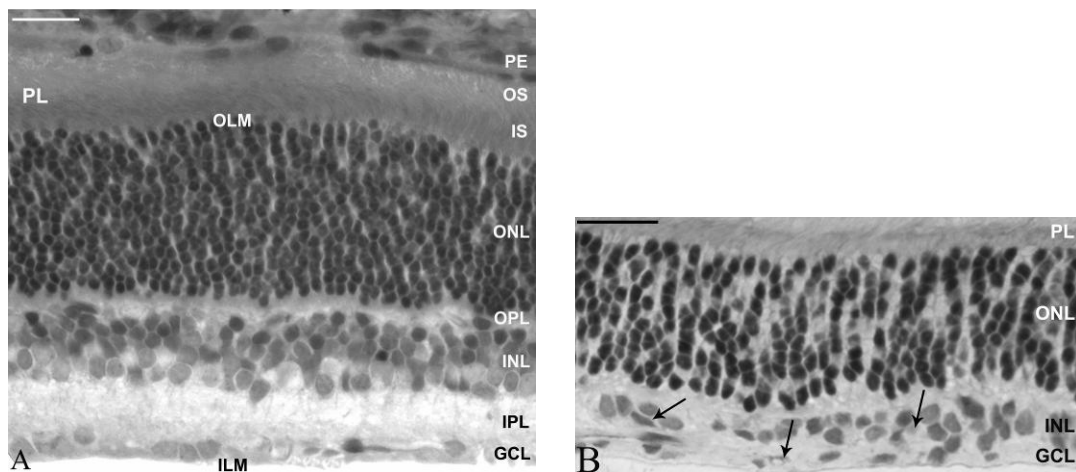
A szövetteni vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a léziós oldalon a kontroll állatoknál a NADPH-diaforáz pozitív neuronok száma 18,14±2,74%-a volt az ép oldalnak, míg a 2µg és 0,2µg PACAP-pal kezelt állatoknál a sejtelhalás ennek fele volt (8,16±3,74% és 8,22±2,05%). Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a PACAP jelentősen javítja a sejtpusztulás mértékét striatalis neurodegeneráció modellben, és ezzel párhuzamosan csökkenti a magatartási deficitiek súlyosságát, illetve elősegíti azok javulását.

III.3. PACAP RETINOPROTEKTÍV HATÁSAINAK VIZSGÁLATA

III.3.1. A PACAP neuroprotektív hatása MSG indukálta retinadegenerációban

Rutin szövettani vizsgálatok

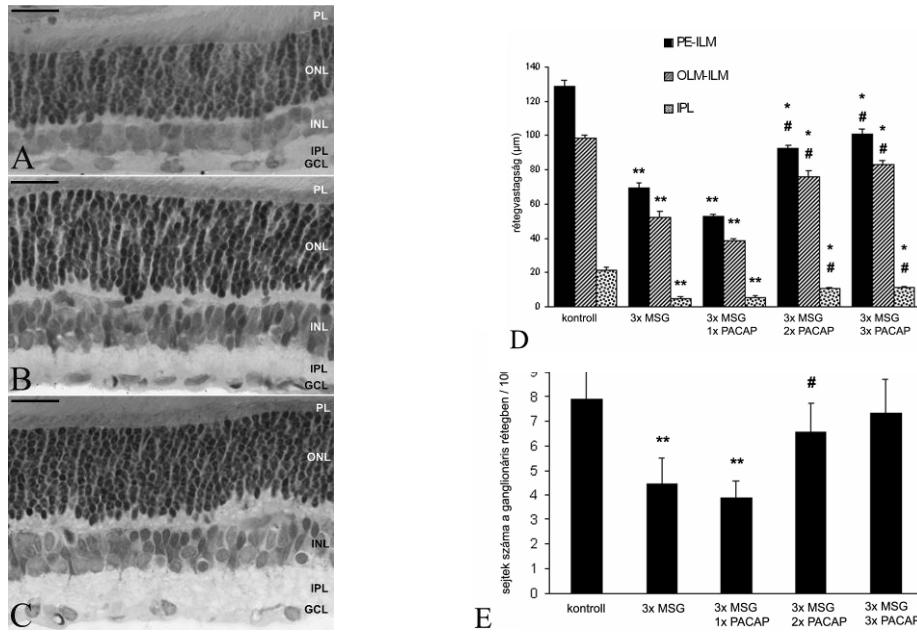
A retina hisztológiai értékelése azt mutatta, hogy az egyszeri MSG adás csak minimális, ezzel szemben a háromszoros és az ötszörös kezelések egyformán súlyos degenerációt idéztek elő. Mivel azonban az ötszöri kezelésnél igen nagy mortalitást tapasztaltunk (több, mint 50%-a az állatoknak elpusztult), ezért a későbbiekben csak a háromszori kezelést alkalmaztuk. A 3xMSG-kezelt állatok retinájának ILM-OLM távolsága megközelítőleg fele akkora volt ($79,7 \pm 4,5 \mu\text{m}$), mint a kezeletlen állatokban mért távolság ($163,7 \pm 5,4 \mu\text{m}$). A károsító hatások leginkább a retina belső rétegeit érintették. A MSG-kezelt állatoknál a fotoreceptor, a külső sejtes és rostos rétegben szignifikáns elváltozást nem találtunk, de a belső sejtes réteg és a ganglionsejtek rétege teljesen összeolvadt. Ezen rétegek vastagsága több mint felére csökkent, a köztük elhelyezkedő belső rostos réteg eltűnt. A kezelés hatására számos szöveti és sejtdegenerációt jelző elváltozás (szövethézagok, piknotikus sejtek) is megfigyelhető volt (**III.3.1. ábra**).



III.3.1. ábra. A retina szövettani képe egy reprezentatív kezeletlen (normál) (A) és egy 3x MSG-kezelt állat (B) retinájából. A nyilak degenerált struktúrákat mutatnak. Rövidítések: PE: photoreceptor réteg, OS: outer segment, IS: inner segment (photoreceptorok külső és belső szegmense), ONL és INL: outer és inner nuclear layer (külső és belső magvas réteg), OPL és IPL: outer és inner plexiform layer (külső és belső plexiform réteg), GCL: ganglionsejtek rétege.

Az MSG kezelés mellett intravitreálisan 1pmol PACAP-pal kezelt állatok retinája nem különbözött a csak MSG-vel kezelt állatok retinájának szerkezetétől, a szisztémás

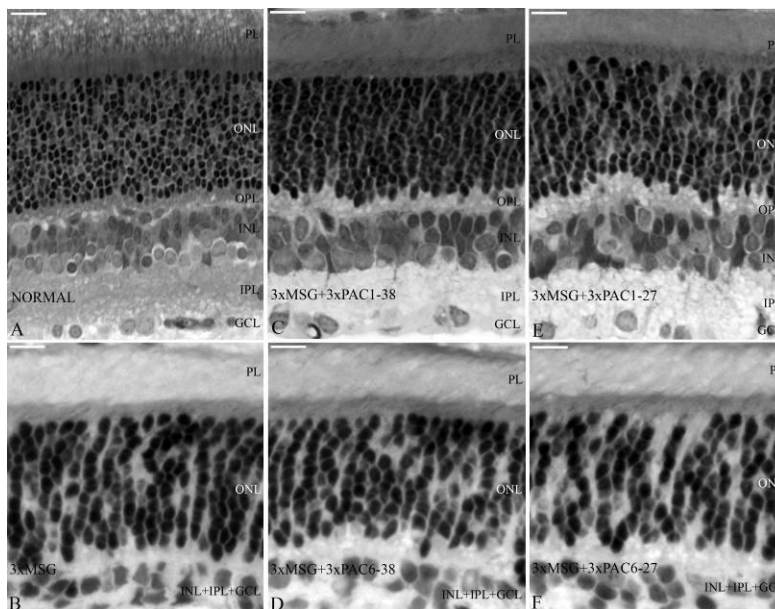
PACAP kezelés pedig csak kismértékű javulást eredményezett. Ezzel szemben a 100pmol dózisban adott lokális PACAP szignifikánsan csökkentette az MSG indukálta retina károsodást. A fent említett 3x alkalmazott MSG-kezeléssel egyidőben, egyszer, kétszer vagy háromszor 100pmol PACAP-pal kezeltük az állatok jobb szemét. Egyszeri PACAP kezelés hatására nem tapasztaltunk jelentős változást az MSG-vel kezelt retinához képest (**III.3.2.A. ábra**). A rétegek vastagsága nem változott, a fúzió okozta torzulás megmaradt, csupán néhány preparátumban figyeltünk meg enyhe javulást. Kétszer (**III.3.2.B. ábra**), illetve háromszor (**III.3.2.C. ábra**) alkalmazott PACAP szignifikánsan csökkentette az MSG-indukálta károsodást. A retina mindhárom belső rétege jól elkülönült egymástól, az IPL egyértelműen látható maradt, az INL megtartotta 2-4 sejt sorát. A belső rétegek szignifikánsan vastagabbak voltak, mint az MSG-kezelt állatoknál (**III.3.2.D. ábra**). A GCL-ben található sejtek száma a normál retinához volt viszonyítható (**III.3.2.E. ábra**).



III.3.2. ábra. Egyszeres (A), kétszeres (B), illetve háromszoros (C) PACAP hatása az MSG-indukálta retinadegenerációban. A retina egyes rétegeinek összehasonlítása (D) és a ganglionsejtek rétegében található sejtek száma/100 μm (E) normál kontroll, MSG, illetve MSG+PACAP-pal kezelt állatokon. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs normál kontroll, # $P < 0,05$ vs MSG kezelés. Aránymérték: 20μm.

A PACAP38 és a PACAP27, valamint a PACAP6-38 és a PACAP6-27 hatásának összehasonlítása MSG-okozta degenerációban

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a PACAP szervezetben előforduló rövidebb változata, a PACAP27 is retinoprotektív hatással rendelkezik. A PACAP antagonistái, a PACAP6-38 és PACAP6-27 pedig az MSG-okozta károsodást súlyosbították (**III.3.3. ábra**). Az ONL-ben jóval több degenerált duzzadt sejtet, illetve több szövethézagot figyeltünk meg, mint a csak MSG-kezelt állatokban. Ezt a morfometriai analízis is alátámasztotta (Atlasz et al., 2009). Mindez arra utal, hogy a PACAP endogén körülmények között is fontos retinoprotektív hatást fejt ki károsító behatások esetén.



III.3.3. ábra. A retina szövettani képe reprezentatív normál kontroll (A), MSG-kezelt (B), MSG+PACAP38 (C), MSG+PACAP6-38 (D), MSG+PACAP27 (E) és MSG+PACAP6-27 (F) állatokból. Rövidítések: GCL: ganglionsejt réteg, INL: belső magvas réteg, IPL: belső rostos réteg, ONL: külső magvas réteg, OPL: külső rostos réteg. Aránymérték: 20 μm.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

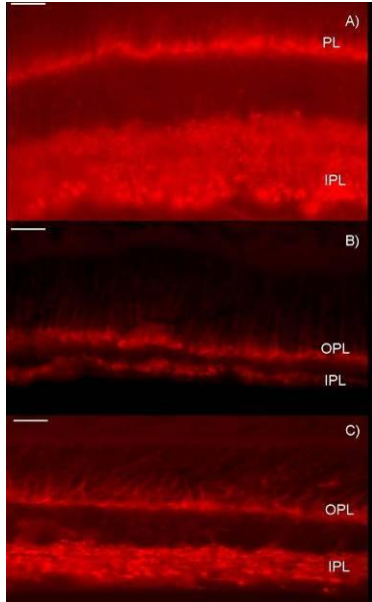
Az OPL-ben elsősorban a fotoreceptor sejtek, míg az IPL-ben a bipoláris sejtek terminálisai jelölődtek VGLUT-1 antiszérummal (**III.3.4.A. ábra**), korábbi leírásokkal egybehangzóan (Gong et al., 2006; Johnson et al., 2003). Háromszori MSG (**III.3.4.B. ábra**) kezelés hatására látványosan csökkent az immunjelölés erőssége és kiterjedése az IPL-ben, ami a bipoláris sejtvégződések nagymértékű károsodására utal. A PACAP-pal kezelt retinában az immunjelölés erőssége nagyobbnak mutatkozott a degenerált

retinában látottakkal szemben (**III.3.4.C. ábra**). Korábbi eredményekkel (Johnson et al., 2003) megegyezően VGAT immunjelölést láttunk a külső és a belső plexiform rétegekben. Glutamát okozta excitotoxikus károsodásban a VGAT immunreaktivitás jelentősen redukálódott. A PACAP hatására a VGAT immunpozitivitás csökkenése kisebb mértékűnek, míg az IPL jelölődése kifejezettebbnek bizonyult.

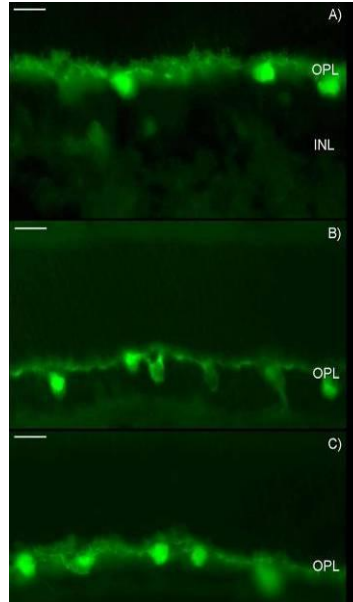
Ismert, hogy a horizontális és a dopaminerg amakrin sejtek calbindint (Hamano et al., 1990), a kolinerg amakrin sejtek calretinint (Gábrriel és Witkovsky, 1998), míg a glicinerg AII-es amakrin sejtek parvalbumint (Wassle et al., 1993) és calbindint (Ishimoto et al., 1989) egyaránt expresszálnak. Normál retinában erőteljes calretinin jelölés volt látható az INL-ben és a GCL-ben, ami kolinerg amakrin sejtek jelenlétére utal. Háromszori MSG kezelés hatására jelentősen csökkent az immunreaktivitás mértéke és a jelölt sejtek száma a normál retinához képest. Ez a jelenség a belső sejtrétegben található struktúrák pusztulásával magyarázható. Intravitreálisan alkalmazott PACAP hatására az amakrin sejtek túlélési aránya jelentős mértékben megnőtt. A calbindin a horizontális és egyes amakrin sejtek sejttestjeiben és a nyúlványaiban található (**III.3.5.A. ábra**). MSG alkalmazás során csak minimális változás következett be az immunjelölés erősségében, mely alapján arra következtetünk, hogy a horizontális sejtek nem károsodnak jelentős mértékben (**III.3.5.B. ábra**). PACAP hatására normál immunreaktivitási mintázatot kaptunk (**III.3.5.C. ábra**).

Patkány retinában korábbi tanulmányokkal megegyezően (Endo et al., 1986) parvalbumin immunreaktivitás az INL proximális részében látható. Innen indulnak azok a nyúlványok, melyek az IPL-ben végződnek. Normál retinában erőteljes parvalbumin pozitivitás figyelhető meg az AII glicinerg amakrin sejtekben. Az MSG kezelésén átesett retinán a jel erőssége kismértékben csökkent, a sejtek nyúlványai nagy százalékban elpusztultak. PACAP alkalmazása ellensúlyozta az MSG neurotoxicitását: a parvalbumin immunexpresszivitási mintázat a normálhoz hasonló volt. Normál körülmények között 3 hetes állatokban a retina Müller-sejtjeiben gyenge GFAP-pozitivitás mutatható ki, főleg a végtalpak területén. MSG okozta károsodás után a GFAP szintjének masszív emelkedése figyelhető meg, melynek következményeként a Müller-sejtek erős immunpozitivitást mutattak a retina teljes területén. PACAP hatására a retina rétegei elkülönültek, azonban a GFAP jelerősség csökkent maradt.

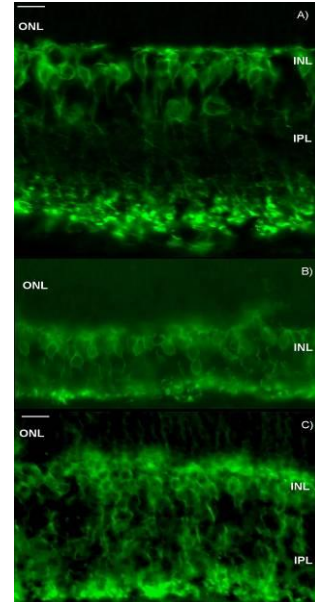
Kontroll állapotban kirajzolódott a belső sejtes rétegben található pálcika bipolaris sejtek erőteljes PKC α aktivitása (**III.3.6.A. ábra**). MSG hatására a bipolaris sejtek axonjai jelentősen megrövidültek (**III.3.6.B. ábra**). Az INL vastagsága jelentősen redukálódott, az IPL szinte teljesen eltűnt. A PACAP kezelést követően a PKC α tartalmú sejtpopuláció immunreaktivitása még mindig csökkent szintet mutatott, ám morfológiája a kontrolléhoz nagymértékben hasonló maradt (**III.3.6.C. ábra**).



III.3.4. ábra. VGLUT-1 immunpozitív sejtek patkány retinában.
(A): normál kontroll,
(B): MSG-kezelt állat,
(C): MSG + PACAP -
kezelt állat.
Aránymérték: 20 μ m.



III.3.5. ábra. Calbindin immunreaktivitás patkány retinában.
(A): normál kontroll,
(B): MSG-kezelt állat,
(C): MSG + PACAP -
kezelt állat.
Aránymérték: 20 μ m.



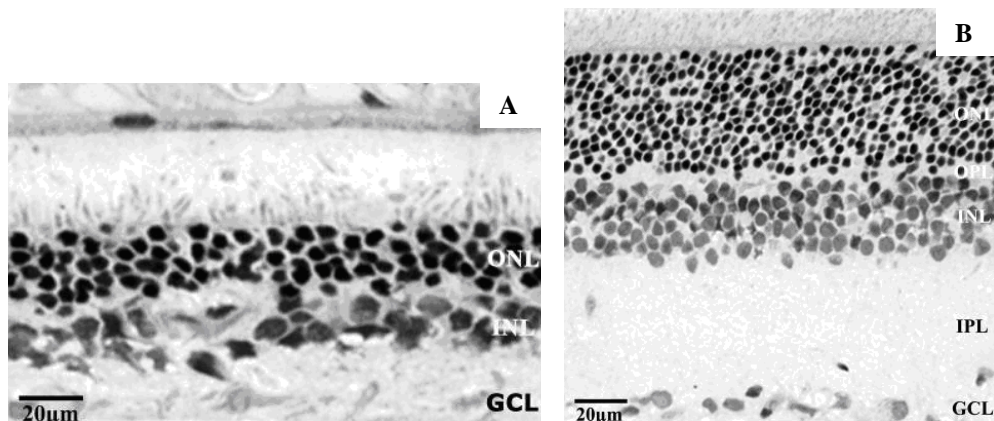
III.3.6. ábra. Fluoreszcens mikrofotográfia PKC α tartalmú bipolaris sejtekről.
(A): normál kontroll,
(B): MSG-kezelt állat,
(C): MSG + PACAP -
kezelt állat.
Aránymérték: 20 μ m.

III.3.2. A PACAP neuroprotektív hatása BCCAO indukálta retina ischaemiában

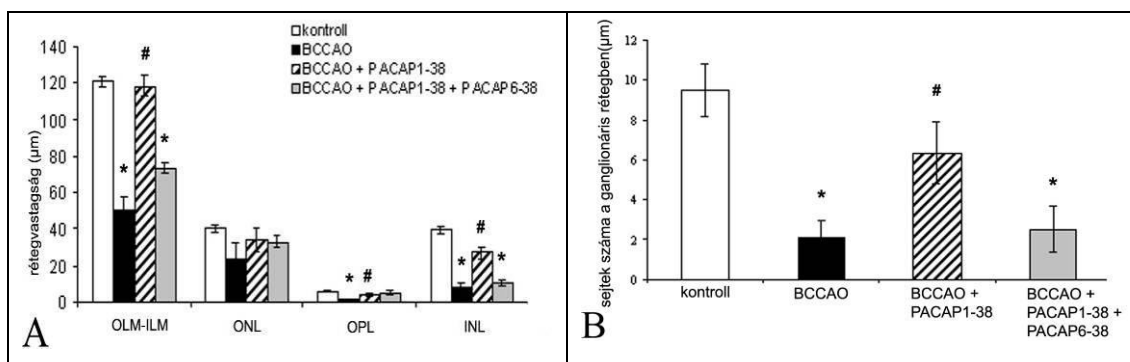
Rutin szövettani vizsgálatok

Két hét posztoperatív idő elteltével a BCCAO-n átesett állatok retinája az áloperált állatokéval összehasonlítva súlyos károsodást mutatott (**III.3.7.A. ábra**). Minden rétegben degenerációs elváltozásokat figyeltünk meg. A legfeltűnőbb elváltozás a plexiform rétegekben volt, aminek következtében az OLM-ILM távolság jelentősen csökkent (**III.3.8.A. ábra**). A fotoreceptorok rétegében a külső szegmensek kisebbek lettek,

szabályos geometriai elhelyezkedésük rendezetlenné vált. A csapok és pálcikák sejttestjei között hézagok jelentek meg. Ennek következtében az ONL vastagsága enyhén csökkent a normál állatok retinájához képest (**III.3.8.A. ábra**). Hasonló hézagokat és degenerálódott képleteket figyelhattunk meg az INL-ben is. Az INL vastagsága szignifikánsan csökkent (**III.3.8.A. ábra**). Az IPL-ben számos, 1µm átmérőjű denz foltot láthattunk, melyek egyenletes eloszlása a bipoláris sejterminálisok degenerálódására utal. Az OPL vastagsága jelentősen redukálódott, mely néhány helyen az ONL és INL teljes fúziójához vezetett (**III.3.7.A. ábra**). A ganglionsejtes rétegben is jelentős mértékű volt a degeneráció, a ganglionsejtek száma szignifikánsan csökkent (**III.3.8.B. ábra**). BCCAO-t követő, intravitreális PACAP hatására a retina fénymikroszkópos anatómiája a normáltól alig tért el (**III.7.B. ábra**). Ezt a morfometriai analízis is alátámasztotta. A retina rétegeinek vastagsága csaknem megegyezett az áloperált állatokéval, és szignifikánsan nagyobbak bizonyult a BCCAO-n átesett állatokhoz viszonyítva (**III.3.8.A. ábra**). Ez különösen szembetűnő az OPL-ben volt, ami a PACAP-pal kezelt állatokban jól látható maradt. PACAP kezelés után csak a ganglionsejtek száma mutatkozott változatlanul alacsonyabbnak az áloperált állatokhoz képest (**III.3.8.B. ábra**). A jelentős neuroprotektív hatás ellenére néhány degeneratív elváltozás továbbra is megfigyelhető volt. A PACAP adása melletti PACAP6-38 kezelés szignifikánsan csökkentette a PACAP retinoprotektív hatását (**III.3.8.A. és B. ábrák**).



III.3.7. ábra: (A) BCCAO műtéten átesett állatok retinájának szövettani képe. Az ONL és az INL a legtöbb helyen fuzionált. (B) BCCAO+PACAP. Az ONL és az INL tisztán elkülönül egymástól.



III.3.8. ábra. (A) A retina rétegeinek morfológiai elemzése áloperált kontroll, BCCAO-n átesett valamint BCCAO+PACAP és BCCAO+PACAP1-38+PACAP6-38 kezeléssel átesett állatokon. (B) A ganglionsejtes réteg 100 μm-re eső sejtek számának összehasonlítása különböző állatcsoportokon. * $P < 0,05$ vs áloperált kontroll; # $P < 0,05$ vs BCCAO műtéten átesett állatok.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

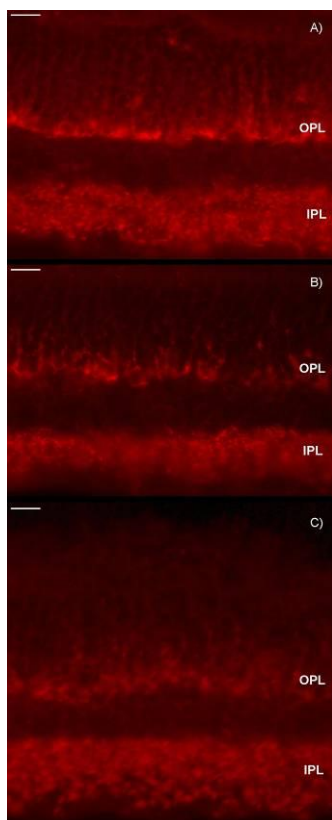
Normál retinában a VGLUT-1 a korábban leírtaknak megfelelő eloszlást mutatott (III.3.9.A. ábra). BCCAO kezelés hatására az immunjelölés erőssége az OPL és az IPL területén csökkent (III.3.9.B. ábra). Mind a fotoreceptor terminálisok, mind a bipoláris sejtek végződése károsodtak. PACAP adását követően a károsodás kisebb mértékű volt (III.3.9.C. ábra). Hasonló mértékben csökkent a VGAT immunexpresszivitása a BCCAO hatására, az OPL immunpozitivitása szinte teljesen eltűnt. PACAP adását követően a VGAT-specifikus immunfestés eredménye a normál retinában látottakkal teljesen megegyezett.

Míg normál körülmények között erőteljes calretinin immunpozitivitást tapasztaltunk, addig a kétoldali carotis lekötés után a calretinin tartalmú kolinerg amakrin sejtek immunpozitivitása csökkent volt. PACAP adása ezt mérsékelte, az INL-ben és a GCL-ben egyaránt jelentős számban maradtak meg calretinint expresszáló sejtek. Áloperált állatokban az INL területén – közvetlenül az OPL határán – találtunk calbindin tartalmú sejteket (III.3.10.A. ábra). Az MSG kezeléssel ellentétben (ahol csak minimális változást tapasztaltunk), kétoldali arteria carotis communis elzárását követően calbindin immunexpresszivitás a retina területén alig volt kimutatható (III.3.10.B. ábra). PACAP adása után mérsékelten pozitív immunfestés volt látható a belső sejtes rétegben (III.3.10.C. ábra).

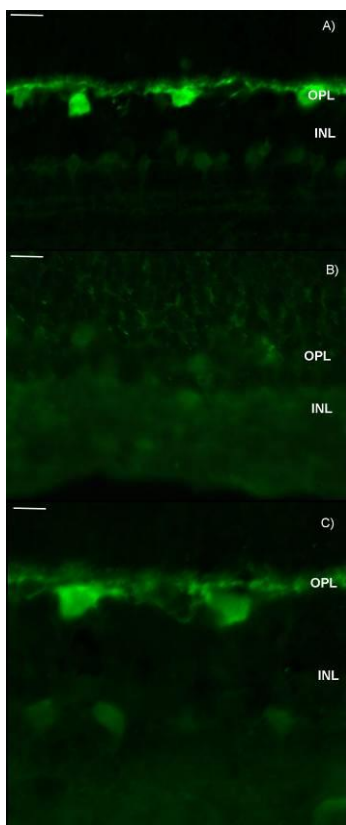
Kísérleteink során azt is vizsgáltuk, hogy BCCAO-t követően hogyan változik a parvalbumin tartalmú AII amakrin sejtek túlélése. Eredményeink azt mutatták, hogy

permanens érleketést követően a Ca^{2+} -kötő parvalbumin tartalmú sejtek immunreaktivitása markánsan csökkent. PACAP alkalmazásával az immunpozitív sejtek száma a normálhoz hasonlóan bizonyult, ám az immunreakció erőssége továbbra is csökkent volt. Ischaemia következtében a Müller-sejtekben a GFAP-expresszió jelentősen fokozódott, hasonlóan az MSG-okozta károsodásban megfigyeltékhez. Ezt a PACAP kezelés nem befolyásolta.

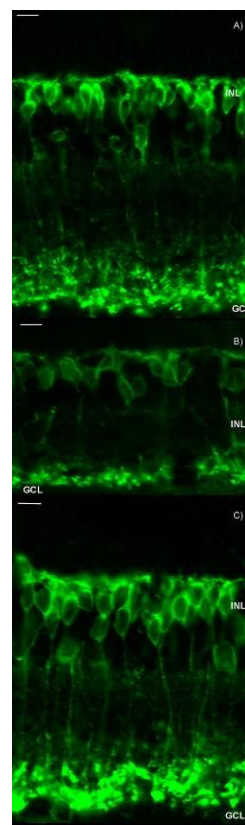
A BCCAO következményeként jelentős neuronkárosodást figyelhattunk meg a pálcska bipolárisok populációjában. A PKC-jelölt sejtek száma a normál állapothoz (**III.3.11.A. ábra**) képest láthatóan csökkent, nyúlványaik immunreaktivitása jelentősen gyengült (**III.3.11.B. ábra**). PACAP adását követően a retina belső rétegeiben, hasonlóan a kontrollhoz, PKC immunpozitivitás volt kimutatható. A sejtestek jól kirajzolódtak, a sejtek nyúlványrendszerének lefutása újra láthatóvá vált (**III.3.11.C. ábra**).



III.3.9. ábra. VGLUT-1 immunpozitív sejtek patkány retinában.
(A): normál kontroll,
(B): BCCAO műtött állat,
(C): BCCAO + PACAP-kezelt állat.
Aránymérték: 20 μm .



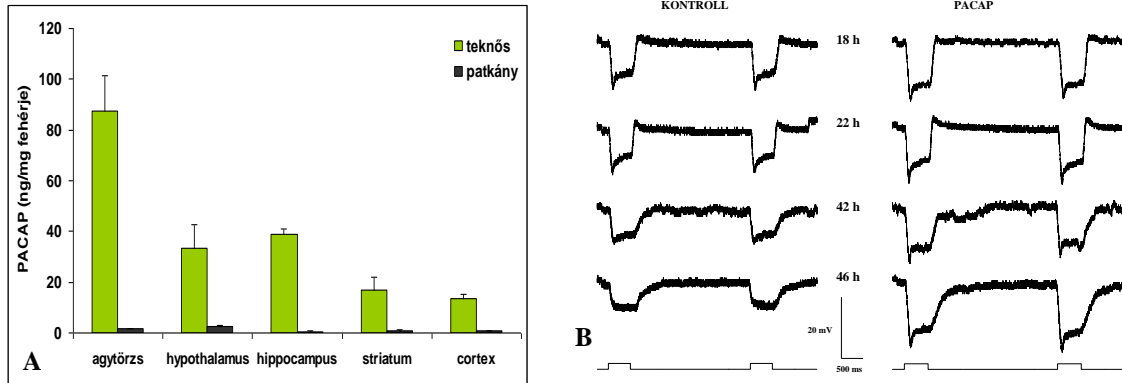
III.3.10. ábra. Calbindin immunreaktivitás patkány retinában.
(A): normál kontroll,
(B): MSG-kezelt állat,
(C): MSG + PACAP -kezelt állat.
Aránymérték: 20 μm .



III.3.11. ábra. Fluoreszcens mikrofotográfia PKC α tartalmú bipoláris sejtekről.
(A): normál kontroll,
(B): MSG-kezelt állat,
(C): MSG + PACAP-kezelt állat.
Aránymérték: 20 μm .

III.3.3. A PACAP retinoprotektív hatásának vizsgálata teknős retinán

RIA analízissel kimutattuk, hogy a teknős idegrendszerében a PACAP27 nagyon alacsony szintet mutat, viszont a PACAP38 koncentrációja a patkány agy hasonló területeivel összehasonlítva 10-100-szoros koncentrációban fordul elő. Legmagasabb koncentrációt az agytörzsben, hippocampusban, striatumban, hypothalamusban és a cortexben mértünk (**III.3.12.A. ábra**).



III.3.12. ábra. (A) PACAP koncentrációk az agy egyes területein teknős és patkányagyban (átlag ng PACAP/mg fehérje \pm SEM). A különbség minden oszloppárnál $P < 0,001$. (B) Kontroll és PACAP-pal kezelt retina-szeletek fényválaszai a kísérlet megkezdése utáni különböző időpontokban.

A PACAP38 retina horizontális sejtek túlélésére kifejtett hatásának vizsgálatok azt találtuk, hogy a PACAP nem gyakorolt akut hatást a horizontális sejtek válaszaira. Mind a kontroll, mind a PACAP-inkubált retina szeletek sejtjeinek fényválasza egy jellegzetes csúcsamplitúdóval rendelkező gyors kezdeti tranziens komponensből, továbbá egy rollback fázisból állt, amit a repolarizációs fázis követett. Későbbi időpontokban (42 és 46 óra után) a kontroll sejtek kezdeti tranziense csökkent, az amplitúdók nagysága szintén csökkent, majd a 46. óra után eltűnt. Ezzel ellentétben a PACAP-pal kezelt sejtek eredeti csúcsválaszai megmaradtak. A kontroll sejtekben a fény-kiváltott válaszok rollback és repolarizációs fázisa lelassult, míg a PACAP-pal kezelt retinában ugyanezen folyamatok sokkal kisebb mértékben jelentkeztek. A fényválaszok amplitúdói - a 0. óra kivételével - minden időpontban nagyobbak voltak a PACAP-inkubált szeletekben, mint a kontrollokban. 18 és 22 óra után a PACAP-pal kezelt sejtek válaszamplitúdói kb 1,2-szeresen felülmúlták a kontroll horizontális sejtekét. A későbbi időpontokban (42 és 46 óra után) ez a különbség több mint kétszeresére növekedett (**III.3.12.B. ábra**).

III.4. A PERINATÁLIS IDEGRENSZERI FEJLŐDÉS VIZSGÁLATA PACAP, PACAP ANTAGONISTA, MSG ÉS HYPOXIA/ISCHAEMIA HATÁSÁRA PATKÁNYBAN

III.4.1. Szomatikus fejlődés

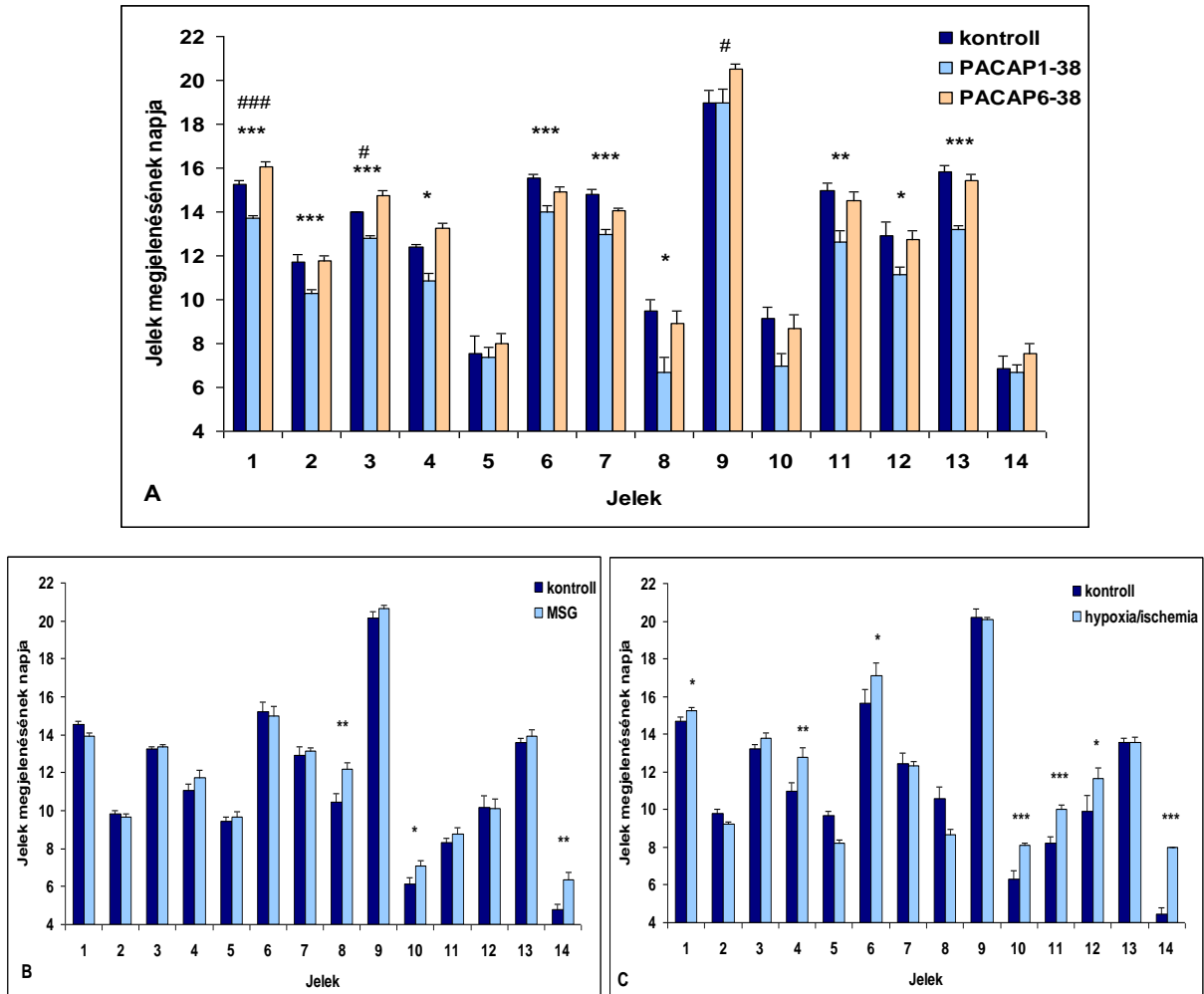
A posztnatális PACAP és a PACAP6-38 kezelés nem változtatta meg az állatok testsúlyát a kontrollokhöz képest. Az MSG-kezelt állatokban viszont szignifikánsan alacsonyabb a testsúly volt a 6. naptól kezdődően (a 3. hét végén: $33,6 \pm 1,4$ g a kontroll csoportban, $24,2 \pm 0,9$ g az MSG csoportban). A hypoxia/ischaemia csoportban is hasonló eredményt kaptunk, a teljes megfigyelési idő alatt alacsonyabb volt az állatok súlya, mint a kontroll állatoké (súlyok a 3. hét végén: $38,3 \pm 0,8$ g a kontroll csoportban, $27,7 \pm 2,3$ g a hypoxia/ischaemia csoportban). A PACAP és MSG kezelés kombinációjakor az állatok súlya hozzávetőleg egy grammal volt több a csak glutamáttal kezeltékhez képest a hatodik naptól kezdve, de ez statisztikailag nem volt szignifikáns.

A PACAP átlagosan 1-1,5 nappal gyorsította a faciális jelek érését, míg a PACAP6-38 kezelés késleltette a szemnyitás és a fül kiegyenesedés megjelenését. A kontroll és MSG-kezelt csoport között nem volt eltérés a fizikális paraméterekben, azaz a szemnyitás, metszőfog kinövés és a fül kiegyenesedés megjelenési napjában. A hypoxia/ischaemia csak a szemnyitás napját késleltette (**III.4.1. ábra**).

III.4.2. Reflexfejlődés

PACAP hatására a legtöbb jel előbb jelent meg, csupán a keresztezett extenzor reflex eltűnése, a felegyenesedési reflex, a hátsó láb ráhelyezési, és mellső láb fogó reflexek megjelenése nem mutatott szignifikáns eltérést a PACAP-kezelt és a kontroll csoport között. A PACAP6-38 csak a hátsó láb ráhelyezési reflex megjelenését késleltette, az a megfigyelési idő végén sem jelentkezett a legtöbb állatnál (**III.4.1.A. ábra**). A megfigyelt reflexek közül az MSG kezelés hatására a mellső láb ráhelyezési- és fogóreflexe, valamint a felegyenesedési reflex magasból leejtéskor szignifikánsan később jelent meg (**III.4.1.B. ábra**). Egyéb reflexek is késtek, de a különbség nem volt szignifikáns. Hypoxia/ischaemia hatására a negatív geotaxis, a fülrángás, a mellső és hátsó végtagi

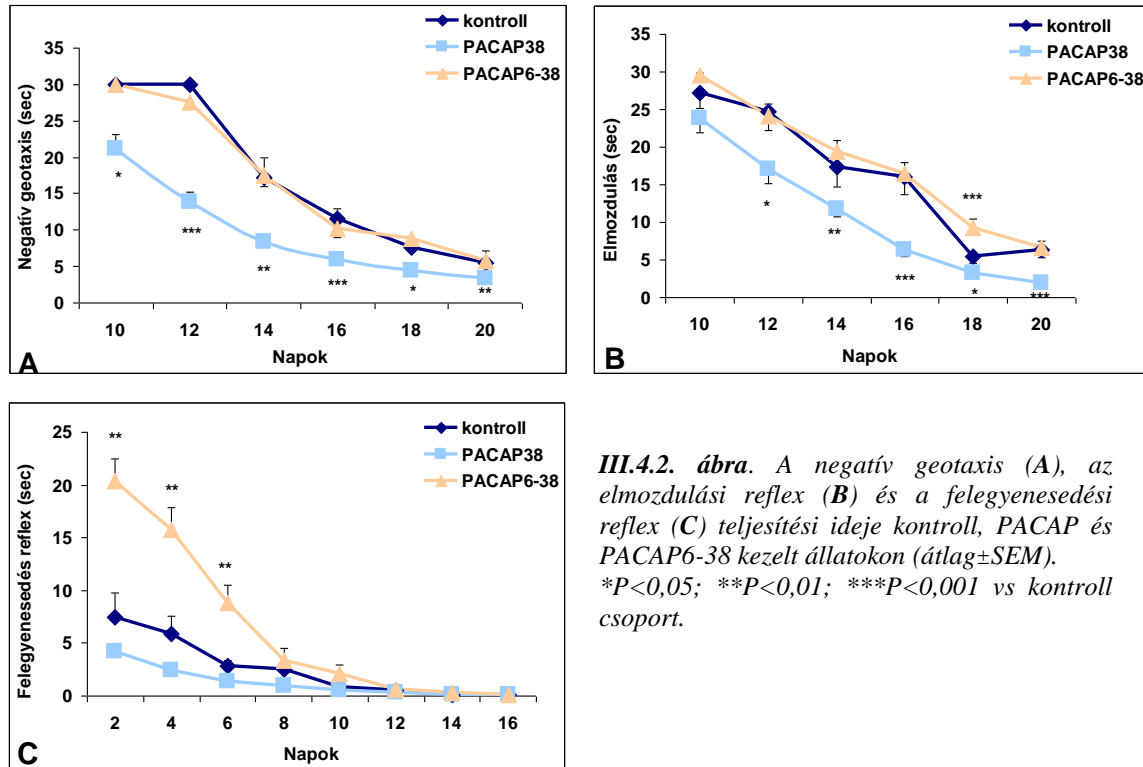
fogóreflex, valamint az elmozdulási és felegyenesedési reflex jelent meg szignifikánsan később (III.4.1.C. ábra).



III.4.1. ábra. Fizikális jelek és neurológiai reflexek megjelenésének napja a PACAP és PACAP6-38 kezeléseket követően (A), az MSG kezelést követően (B) és a hypoxia/ischaemia csoportban (C). Az X tengelyen feltüntetett számok a következő jelek/reflexek megjelenési napját jelölik: 1: szemnyitás; 2: metszőfog kinövés; 3: fülfiegyenesedés; 4: negatív geotaxis; 5: keresztezett reflex eltűnése; 6: fülrángás reflex; 7: szemhéjreflex; 8: elülső végtag ráhelyezési reflex; 9: hátsó végtag ráhelyezési reflex; 10: elülső végtag fogóreflex; 11: hátsó végtag fogóreflex; 12: elmozdulási reflex; 13: akusztikus megrettenési reflex; 14: magassból felegyenesedési reflex. * $P < 0,05$; # $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ### $P < 0,001$ vs kontroll csoport. Az A ábrán a * a PACAP-, a # a PACAP6-38-kezelt csoportra vonatkozik.

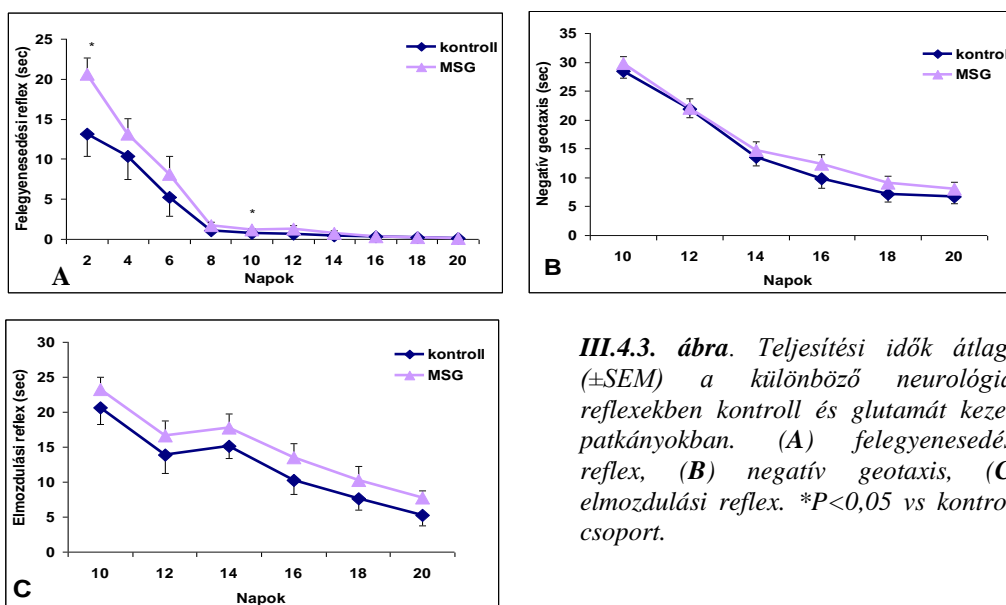
PACAP hatására az állatok rövidebb idő alatt teljesítették a kijelölt feladatokat. A negatív geotaxisban a PACAP-pal kezelt állatok a megfigyelési időtartam alatt végig jobban teljesítettek, mint a kontrollcsoport, ugyanakkor a kontroll és a PACAP6-38-kezelt egyedek teljesítménye közt nem volt eltérés (III.4.2.A. ábra). Az elmozdulási reflexben a PACAP kezelés 12-20 napos korban mutatott jelentős serkentő hatást. A PACAP6-38

csak a 18. napon késleltette szignifikánsan ezt a reflexteljesítményt (**III.4.2.B. ábra**). A felegyenesedési reflexben a PACAP antagonistá kezelés hatására az állatok hosszabb idő alatt fordultak meg, mint a kontroll csoport egyedei 2-6 napos korban (**III.4.2.C. ábra**), míg a PACAP kezelésnek nem volt kimutatható hatása a teljesítési időre.



III.4.2. ábra. A negatív geotaxis (A), az elmozdulási reflex (B) és a felegyenesedési reflex (C) teljesítési ideje kontroll, PACAP és PACAP6-38 kezelt állatokon (átlag±SEM). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ vs kontroll csoport.

Az MSG-kezelt egyedek és a kontrollok esetében a teljesítmény progressziója hasonló volt a megfigyelt 3 hét alatt, de bizonyos teszteknel a végrehajtási idő megnyúlt a kontrollokhoz képest. A felegyenesedési reflexteljesítmény lassabb volt MSG kezelés után a 2. és 10. napon (**III.4.3.A. ábra**). A negatív geotaxis és az elmozdulási reflexteljesítmény csak enyhe késlekedést mutatott a kontroll csoporthoz viszonyítva (**III.4.3. B. és C. ábrák**).

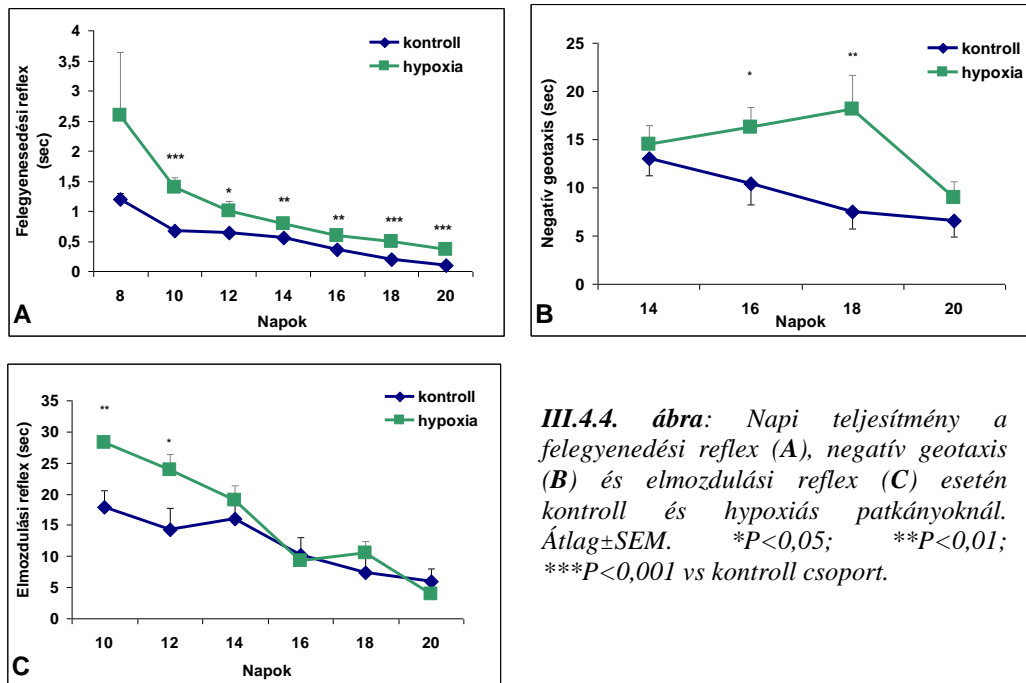


III.4.3. ábra. Teljesítési idők átlaga (\pm SEM) a különböző neurológiai reflexekben kontroll és glutamát kezelt patkányokban. (A) felegyenesedési reflex, (B) negatív geotaxis, (C) elmozdulási reflex. * $P < 0,05$ vs kontroll csoport.

A PACAP és MSG kezelés kombinációja esetén a PACAP képes volt kivédeni az MSG reflexek megjelenését késleltető hatását: a mellső láb ráhelyezési reflex megjelenésének napja a kontroll, MSG és MSG+PACAP csoportokban a következő volt: $10,46 \pm 0,46$; $12,17 \pm 0,32$ ($P < 0,05$ vs kontroll és PACAP-pal kezelt csoport), és $11,93 \pm 0,26$. Hasonlóan, a mellső végtag fogóreflex megjelenésének napja nem késett a kontrollokhoz képest a PACAP+MSG kezelés után (kontroll: $6,15 \pm 0,31$; MSG: $7,05 \pm 0,32$ $P < 0,05$ vs kontroll és MSG+PACAP csoport, MSG+PACAP: $6,07 \pm 0,23$). A felegyenesedési reflex késését a PACAP nem védte ki teljesen, de szignifikánsan csökkentette a különbséget (napok: $4,76 \pm 0,30$ a kontroll; $6,35 \pm 0,41$ az MSG és $5,71 \pm 0,19$ a PACAP+MSG-kezelt csoportokban). A felegyenesedési reflexben mutatott rosszabb teljesítményt a PACAP kezelés 2 hetes korban kivédte: a reflex végrehajtási ideje $0,61 \pm 0,02$; $1,32 \pm 0,4$ és $0,75 \pm 0,07$ volt a kontroll, MSG és MSG+PACAP-pal kezelt csoportokban, ahol a szignifikáns különbség megszűnt a kontroll és MSG+PACAP-pal kezelt csoportok között.

A hypoxia/ischaemia esetén a reflexek végrehajtási ideje szignifikánsan hosszabb volt a kontroll reflexidejéhez képest a felegyenesedési reflexben (**III.4.4.A. ábra**), a negatív geotaxisban (**III.4.4.B. ábra**) és az elmozdulási reflexekben egyaránt (**III.4.4.C.**

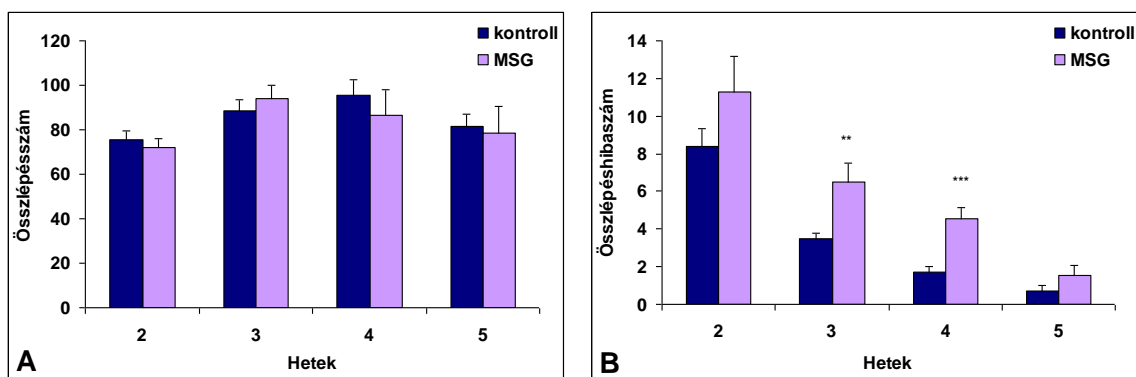
ábra). A megfigyelési idő végére a hypoxiás csoport egyedei beérték teljesítményükben a kontrollokat.



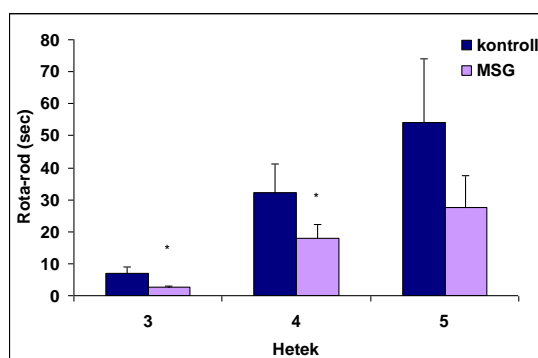
III.4.4. ábra: Napi teljesítmény a felegyedési reflex (A), negatív geotaxis (B) és elmozdulási reflex (C) esetén kontroll és hypoxiás patkányoknál. Átlag±SEM. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ vs kontroll csoport.

III.4.3. A motoros koordináció fejlődése

A PACAP és PACAP6-38-kezelt állatoknál a motoros koordináció tesztekben nem tapasztaltunk eltérést a kontroll csoporthoz képest. Az MSG-kezelt állatok a lépésszámolós tesztekben ugyanannyi lépést tettek meg egy perc alatt, mint a kontroll állatok (III.4.5.A. ábra). Ugyanakkor a lépéshibák száma magasabb volt mind a mellső, mind a hátsó lábbal a kezelt csoportban az 5 hetes megfigyelési periódus folyamán végig (III.4.5.B. ábra). A glutamát-kezelt egyedek rosszabb teljesítményt nyújtottak a mókuseréken is, ahol kevesebb ideig tudtak a forgó keréken maradni, mint kontroll társaik (III.4.6. ábra). Az egyéb motoros koordinációs tesztek esetén nem volt szignifikáns eltérés a két állatcsoport között, csupán tendenciát figyeltünk meg, miszerint a glutamát-kezelt állatok rosszabbul teljesítettek. Az MSG és PACAP kezelés kombinációjakor a PACAP-pal is kezelt állatok 2 hetes korban szignifikánsan kevesebbet hibáztak, mind a mellső, mind a hátsó végtaggal, mint a glutamát-kezelt csoport (összes hibaszám: $11,3 \pm 1,9$ az MSG-kezelt csoportban, $8,1 \pm 1,7$ a PACAP+MSG-kezelt csoportban, $P<0,05$).

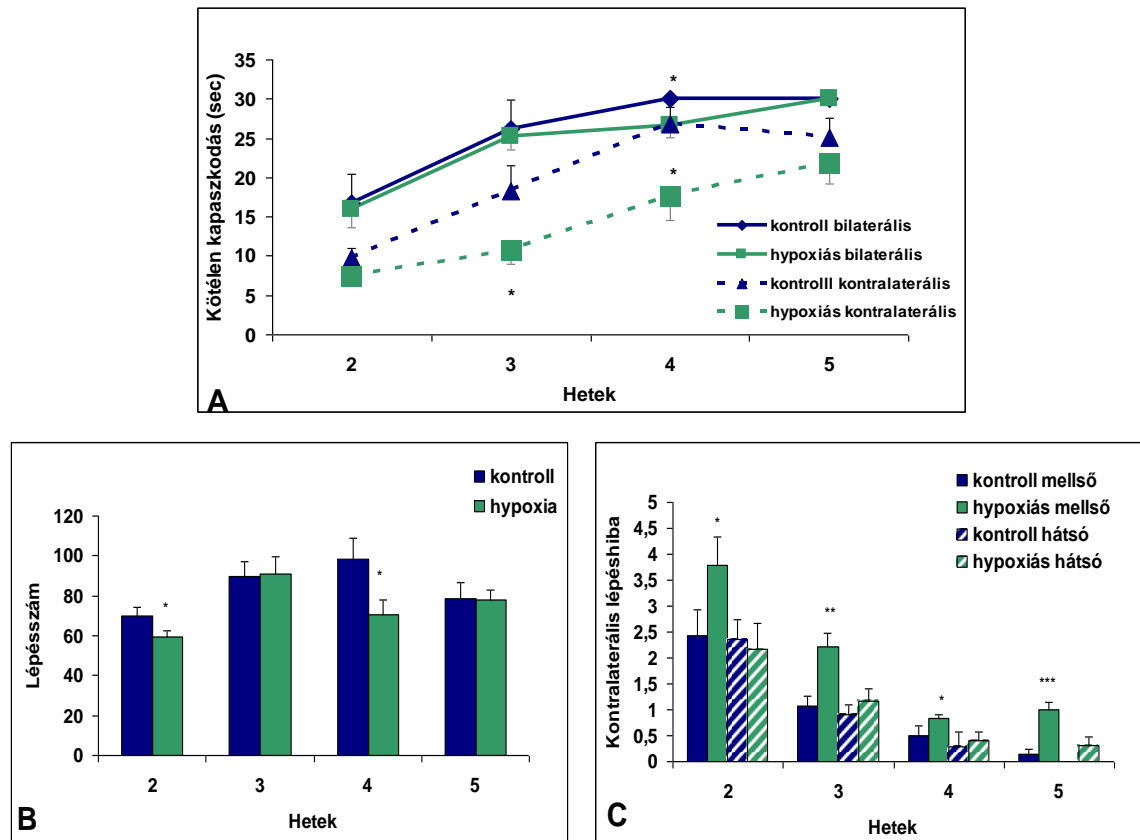


III.4.5. ábra. Összlépésszám (A) és lépéshiba (B) a kontroll és glutamát-kezelt csoportban a postnatalis 5. hétig. Átlag \pm SEM. ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ vs kontroll csoport.



III.4.6. ábra. Mókuserék teszteljesítmény kontroll és glutamát-kezelt állatokban (átlag \pm SEM) 3-5 hetes korban. * $P<0,05$ vs kontroll.

A hypoxiás/ischaemiás állatok a kötélén függeszkedés tesztben előbb leestek 3 és 4 hetes életkorban, mint a kontrollok abban az esetben, ha csak a kontralaterális (jobb) mellső végtagjukat használhatták. Két mellső végtag használata esetén csak 4 hetesen volt jelentős eltérés a két csoport közt (**III.4.7.A. ábra**). A lépésszámolás-lépéshiba tesztben a hypoxiás csoport egyedei szignifikánsan kevesebbet léptek 2 és 4 hetes korban és többet hibáztak a kontralaterális mellső végtagjukkal a megfigyelési idő során (**III.4.7.B. és C. ábrák**). A kapaszkodási tesztben csak 2 hetes korban volt szignifikáns különbség: a maximális dőlésszög, ahol az állatok fenn tudtak maradni $46,1\pm1,9$ volt a kontroll, és $36,9\pm2,1$ volt a hypoxiás állatoknál ($P<0,05$). A többi motoros koordinációs tesztben nem volt különbség a két csoport között.



III.4.7. ábra. Normál és hypoxiás állatok motoros koordinációs tesztekben nyújtott teljesítménye. (A) Kötélkapaszkodás mindkét, vagy kontralaterális végtaggal. (B) Összlépésszám a lépéshiba testben. (C) Kontralaterális (jobb oldali elülső és hátsó végtagok) lépéshibaszámlák. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs kontroll csoport.

III.4.4. Open-field magatartás

Az open-field testben a legmarkánsabb eltéréseket a glutamát-kezelt csoportban találtuk. A mozgással töltött idő, az érintett zónák száma, a megtett távolság és az ezekből számolható mozgási sebesség a lokomotoros aktivitás jellemzői ebben a testben. Általánosságban a glutamát-kezelt állatok az első 3 héten hyperaktívok voltak, különösen 2 hetes korban, amikor a kontroll egyedek még nagyon keveset mozogtak. A mozgással töltött idő és az érintett terület nagysága több, mint duplája volt a kontroll állatokénak. Négy hetes korra a legtöbb különbség eltűnt, míg 8 hetes életkort elérve a glutamát-kezelt egyedek már kevesebbet mozogtak a kontrollokhoz képest. A vertikális irányú mozgások megfigyelése során az ágaskodások száma azonos volt a két csoportban a megfigyelési idő legnagyobb részében, viszont 3 hetes korban a glutamát-kezelt állatok kevesebb fejemelgetést mutattak. Nem mutatkozott eltérés a mosakodási magatartásban és a

habituációs indexben. A fal mellett töltött idő aránya (thigmotaxis) 3 hetes kortól alacsonyabb volt a glutamát-kezelt állatoknál (**III.4.1. táblázat**).

III.4.1. táblázat. Open-field aktivitás a kontroll és a glutamát-kezelt csoportban 2, 3, 4, 6 és 8 héttel születés után. Átlag \pm SEM. * $P<0,05$; ** $P<0,01$ vs kontroll csoport.

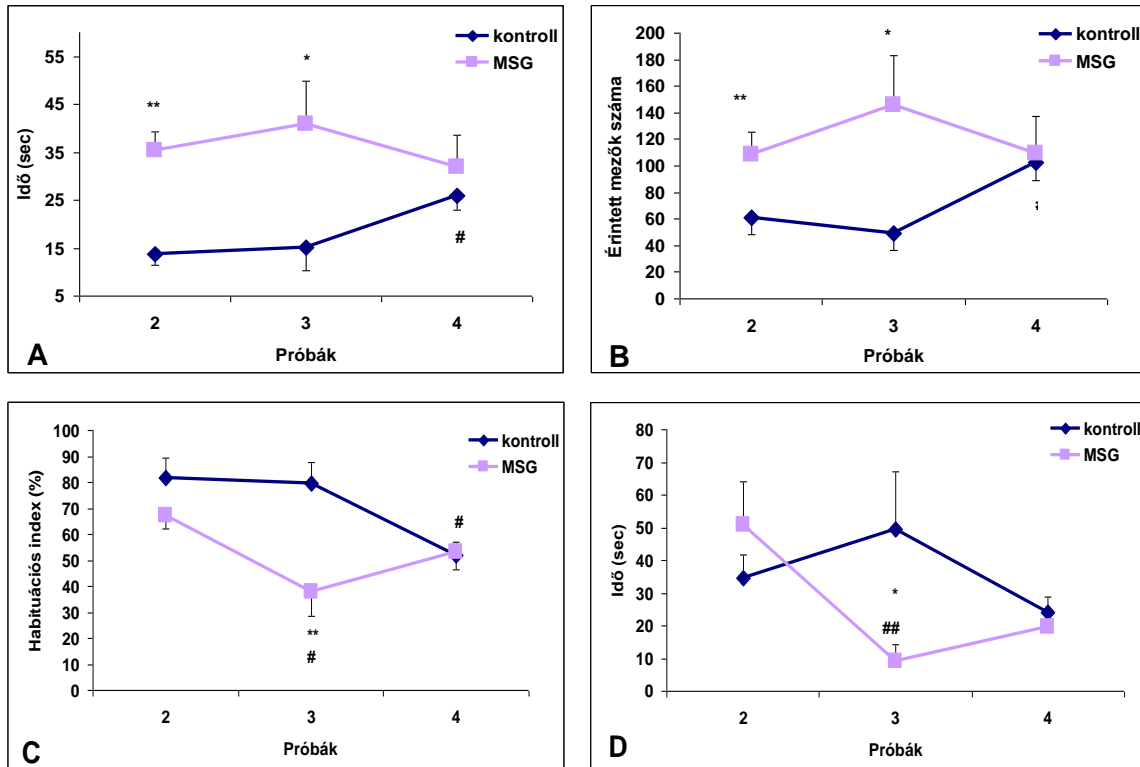
Jel	2 hét		3 hét		4 hét		6 hét		8 hét	
	Kontroll	MSG	Kontroll	MSG	Kontroll	MSG	Kontroll	MSG	Kontroll	MSG
Mozgással töltött idő (másodperc)	28,1 $\pm 8,7$	64,6 $\pm 10,1^*$	108,4 $\pm 19,2$	133,9 $\pm 10,1$	136,8 $\pm 16,9$	146,3 $\pm 8,1$	97,5 $\pm 15,2$	105,5 $\pm 13,4$	98,8 $\pm 6,9$	86,8 $\pm 3,5$
Keresztezett mezők száma	10,4 $\pm 2,9$	29,2 $\pm 5,4^*$	114,3 $\pm 20,0$	165,8 $\pm 12,7^*$	231,0 $\pm 30,4$	212,7 $\pm 12,1$	147,0 $\pm 24,2$	147,7 $\pm 19,7$	175,4 $\pm 12,7$	138,8 $\pm 6,5^*$
Megtett táv (cm)	58,6 $\pm 16,6$	164,2 $\pm 30,7^*$	639,1 $\pm 110,0$	926,1 $\pm 71,5^*$	1295,3 $\pm 170,0$	1213,7 $\pm 68,1$	826,7 $\pm 136,3$	830,4 $\pm 138,7$	986,6 $\pm 71,5$	780,1 $\pm 36,4^*$
Sebesség (cm/perc)	128,9 $\pm 12,7$	144,9 $\pm 10,8$	332,7 $\pm 38,4$	415,3 $\pm 20,2^*$	576,8 $\pm 36,8$	500,0 $\pm 14,7^*$	500,2 $\pm 25,2$	463,9 $\pm 30,8$	611,1 $\pm 45,7$	541,0 $\pm 17,3$
Fejemelgetés	3,8 $\pm 0,7$	7,1 $\pm 1,3$	31,1 $\pm 4,8$	17,3 $\pm 2,3^{**}$	28,3 $\pm 3,3$	22,0 $\pm 0,5$	22,4 $\pm 2,8$	17,9 $\pm 2,4$	21,4 $\pm 1,7$	20,1 $\pm 2,0$
Ágaskodás	0,4 $\pm 0,2$	1,6 $\pm 0,6$	9,3 $\pm 2,9$	13,8 $\pm 0,9$	16,6 $\pm 2,7$	19,1 $\pm 2,4$	14,2 $\pm 2,9$	15,3 $\pm 2,7$	16,4 $\pm 1,6$	14,6 $\pm 2,2$
Mosakodás (másodperc)	33,5 $\pm 9,7$	35,1 $\pm 5,1$	48,4 $\pm 13,7$	35,6 $\pm 8,6$	18,1 $\pm 4,3$	13,4 $\pm 3,1$	14,5 $\pm 7,0$	7,8 $\pm 3,1$	16,8 $\pm 5,9$	15,4 $\pm 3,0$
Habituáció (%)	52,4 $\pm 13,3$	51,9 $\pm 9,8$	40,2 $\pm 9,1$	37,7 $\pm 1,8$	34,8 $\pm 4,3$	35,7 $\pm 1,5$	27,4 $\pm 3,5$	32,6 $\pm 1,9$	34,5 $\pm 3,5$	34,7 $\pm 2,3$
Fal mellett töltött idő (másodperc)	144,3 $\pm 42,2$	230,4 $\pm 19,9$	248,8 $\pm 17,9$	200,3 $\pm 17,8^*$	227,1 $\pm 12,8$	190,1 $\pm 7,6^*$	236,1 $\pm 11,4$	208,6 $\pm 15,7^*$	239,3 $\pm 11,0$	202,3 $\pm 6,6^{**}$

A hypoxia/ischaemiás csoportban és a PACAP6-38-cal kezelt csoportban nem találtunk kiugró eltéréseket az állatok általános mozgásmintázata tekintetében a kontroll csoporttal össze-hasonlítva. A PACAP-pal kezelt állatoknál mindössze 3 hetes korban észleltünk különbséget: kevesebb időt töltöttek a falak mentén és egyetlen zónában, valamint több mezőt érintettek.

III.4.5. Újdonságkereső magatartás (novelty seeking)

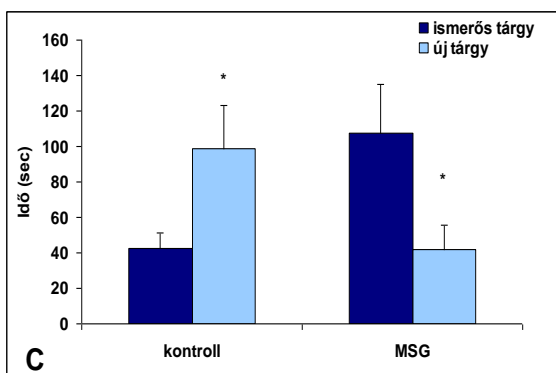
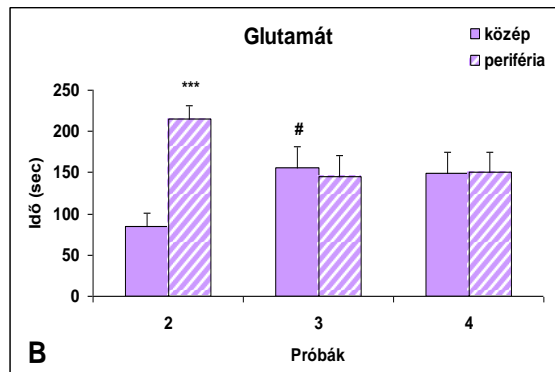
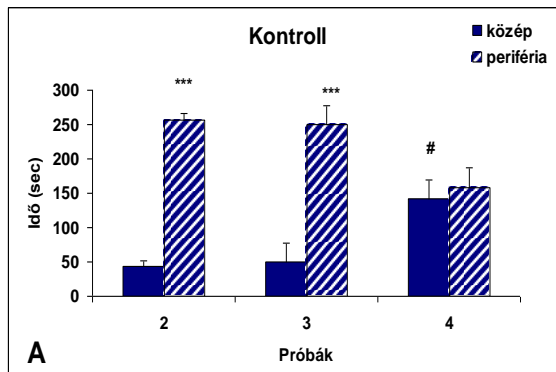
A 2. és 3. próba során, mikor ugyanaz a tárgy volt a térbe helyezve, nem volt eltérés ugyanazon csoportok egyedei között, de összességében a glutamát-kezelt csoport szignifikánsan aktívabbnak bizonyultak a kontroll csoportnál (**III.4.8.A. és B. ábrák**). A kontroll patkányok aktivitása jelentősen emelkedett az új tárgy behelyezése után a 4. próbában. A glutamát-kezelt egyedeknél ellentétesen, csökkent az aktivitás a 4. próba során. A kontroll csoport habituációs indexe nem változott a 2. és 3. próba során, az

állatok az egyes próbák első 90 másodpercében mozogtak a legtöbbet (**III.4.8.C. ábra**). A habituáció szignifikánsan csökkent a 4. próbában. A glutamát-kezelt egyedek ellentétes mintázatot mutattak: a habituáció csökkent a 3., majd emelkedett a 4. próba során. A mosakodó magatartás is ellentétes volt a két csoport között (**III.4.8.D. ábra**).



III.4.8. ábra. Mozgással töltött idő (A), érintett mezők száma (B), habituációs index (C) és mosakodási idő (D) a kontroll és a glutamát-kezelt csoportok újdonságkereső vizsgálatában a 2-4. próba folyamán. Átlag \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ a kontrollhoz képest, # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ ugyanazon csoporton belül az előző próbához hasonlítva.

A középben, vagyis az új tárgy közelében, és a periférián eltöltött idő arányának összehasonlításakor a 2. próba során minden állat több időt töltött a periférián, mint középben (**III.4.9.A. és B. ábrák**). Ez az arány a kontroll egyedekben nem változott meg a 3. próba során sem, de a középben töltött idő szignifikánsan megemelkedett a 4. próba folyamán: az állatok több időt töltöttek el a behelyezett új tárgy közelében (**III.4.9.A. és C ábrák**). A glutamát-kezelt csoportnál a középben és a periférián töltött idő nagysága már a 3. próba során megegyezett (**III.4.9.B. ábra**). Ezek az állatok a 4. próbában kevesebb időt töltöttek az új tárgy mellett, mint a kontroll egyedek (**III.4.9.C. ábra**).

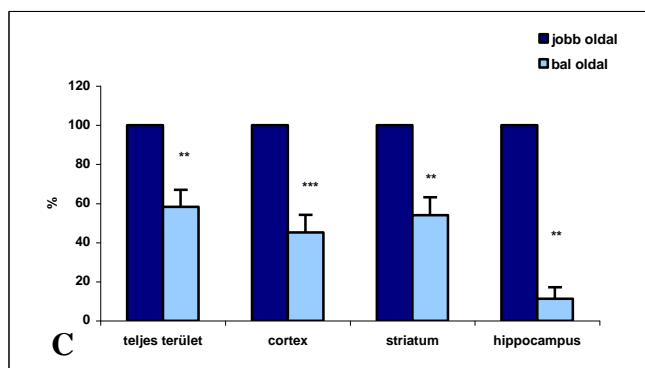
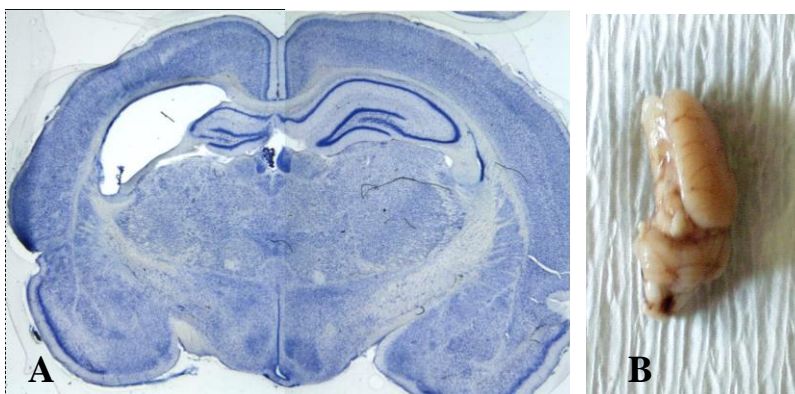


III.4.9. ábra. A középben és periférián eltöltött idők aránya újdonságkereső magatartás közben a 2-4. próba során kontroll (A) és glutamát-kezelt egyedekben (B), valamint a 4. próbában a kontroll és kezelt állatoknál a régi és az új tárgy közelében eltöltött idő (C). Átlag \pm SEM * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ a kontrollal összehasonlítva, # $P < 0,05$ ugyanazon csoporton belül az előző próbához hasonlítva.

III.4.6. Szövettani vizsgálatok

A glutamát kezelésnél a nucleus arcuatus TH-immunhisztokémiai vizsgálata azt mutatta, hogy MSG hatására jelentősen csökkent a TH-pozitív sejtek száma: a kezelt egyedek esetén $12,7 \pm 0,1\%$ -ra ($P < 0,001$) a normál egyedekéhez (100%) képest. A PACAP-pal is kezelt csoportban a sejtszám magasabb, a normál sejtszám $35,2 \pm 8,8\%$ -a ($P < 0,01$ a kontrollhoz képest). Az MSG kezelés kifejezett retinális degenerációt okozott, melyet a PACAP jelentős mértékben ellensúlyozott, ennek bemutatására a III.3. fejezetben került sor.

A hypoxia/ischaemia csoportban a hypoxia súlyos féltekei atrophíát okozott (III.4.10. ábra). Az ipszilaterális félteke térfogata az ép kontralaterálishoz képest átlagosan 58% volt. A legsúlyosabb károsodás a hippocampusban volt megfigyelhető, aminek mérete csak 11%-a volt a károsodott féltekében az éphez képest. 50% körüli csökkenés volt a cortex és a striatum térfogatában, ami az oldalkamra következményes, több, mint 500%-os megnagyobbodásával járt (III.4.10. ábra).



III.4.10. ábra: (A) Egy reprezentatív szövettani kép Nissl festéssel egy hypoxiás/ischaemiás károsodott agyról. (B) Egy extrém mértékben károsodott hypoxiás állat agyának makroszkópos képe. (C) Az ipszilaterális félteke mérete az ép kontralaterális félteke méretéhez képest. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ az ép oldalhoz képest

III.4.7. Embrionális PACAP antagonistá kezelés hatása a viselkedésmintázatra csirkében

Az embrionális kor második felében történt fiziológiás sóoldat, illetve PACAP6-38 kezeléseket követően minden állat kikelt. Az embrionális kor első felében kezelt kontroll állatok közül mindössze 2 állat nem kelt ki. Az embrionális kor első felében (E8) PACAP6-38-cal kezelt csoportban azonban az állatok fele embrionális korban elpusztult, néhány a kikelés közben. Az állatok súlya között nem volt különbség. Az E8 napos korban kezelt állatok általános magatartása azt mutatta, hogy az antagonistával kezelt csoport a megszokott környezetben aktívabb volt, az állatok szignifikánsan többet futottak, tollászkodtak, csipkedtek (III.4.2. táblázat). Az embrionális kor második felében kezelt állatoknál semmilyen különbséget nem figyeltünk meg.

III.4.2. táblázat. Általános aktivitás a kikelés után 21 napig tartó megfigyelés alatt. Az adatokat az adott aktivitási jelet prezentáló állatok %-ában adtuk meg (\pm SEM), délelőtt (de), délután (du) és összesítve. * $P < 0,05$ vs kontroll csoport.

		állatok %-a \pm SEM				állatok %-a \pm SEM	
		Kontroll	PACAP 6-38			kontroll	PACAP 6-38
Állás	De	87,5 \pm 7,0	88,6 \pm 2,7	Tollázkodás	de	6,4 \pm 1,3	9,1 \pm 0,9
	Du	91,2 \pm 3,4	86,6 \pm 2,0		du	7,4 \pm 0,9	10,2 \pm 1,7
	Össz	89,6 \pm 3,5	87,5 \pm 1,6		össz	6,9 \pm 0,7	9,7 \pm 1,0*
Evés	De	32,4 \pm 8,5	26,5 \pm 5,1	Csipkedés	de	12,4 \pm 1,4	20,2 \pm 2,5*
	Du	25,1 \pm 6,4	30,4 \pm 4,2		du	12,7 \pm 1,6	14,4 \pm 1,1
	Össz	28,3 \pm 5,0	28,7 \pm 3,2		össz	12,6 \pm 1,1	16,9 \pm 1,4*
Ivás	De	4,0 \pm 1,2	4,8 \pm 1,9	Tollesipkedés	de	5,7 \pm 1,2	6,7 \pm 1,1
	Du	3,1 \pm 0,5	5,4 \pm 0,6*		du	5,1 \pm 1,1	4,8 \pm 1,3
	Össz	3,5 \pm 0,5	5,2 \pm 0,9		össz	5,3 \pm 0,8	5,7 \pm 0,8
Futás	De	9,7 \pm 1,6	16,2 \pm 1,6*	Összes csipkedés	de	18,1 \pm 1,8	26,9 \pm 2,8*
	Du	14,2 \pm 2,1	15,1 \pm 1,7		du	17,8 \pm 1,1	19,3 \pm 2,2
	Össz	12,2 \pm 1,5	15,5 \pm 1,2		össz	17,9 \pm 0,9	22,9 \pm 1,9*

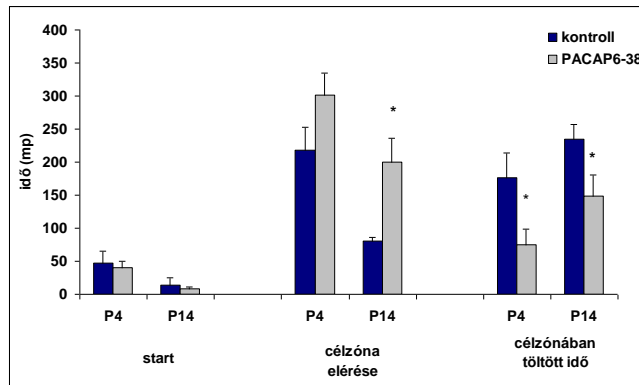
Az E8 korban PACAP6-38-cal kezelt állatok a 2 napos korban végzett open-field tesztben is aktívabbak voltak, majd ez a különbség megszűnt 2 hetes korra (**III.4.3. táblázat**).

III.4.3. táblázat. Open-field teszt aktivitás 2 napos és két hetes korban a kikelés után. Átlag \pm SEM. * $P < 0,05$ vs kontroll csoport.

	2. nap		2. hét	
	kontroll	PACAP6-38	kontroll	PACAP6-38
Lépések száma	121,1 \pm 22,6	189,1 \pm 25,8*	127,1 \pm 13,7	120,7 \pm 13,5
Érintett zónák száma	43,5 \pm 8,5	63,4 \pm 7,9 *	58,8 \pm 6,9	60,7 \pm 5,8
Inaktivitási idő (mp)	203,6 \pm 17,7	167,9 \pm 15,7*	162,5 \pm 15,2	163,4 \pm 12,7
Fal mellett töltött idő (mp)	181,6 \pm 16,9	162,3 \pm 21,2	193,8 \pm 12,5	147,1 \pm 11,6*
Első lépés (mp)	23,1 \pm 11,7	20,9 \pm 9,7	6,5 \pm 2,4	5,0 \pm 1,9
Első vokalizáció (mp)	7,3 \pm 1,5	13,6 \pm 5,2	4,4 \pm 1,1	6,6 \pm 1,5
Futások száma	5,3 \pm 2,1	8,1 \pm 1,8	1,2 \pm 0,4	1,8 \pm 1,0
Ugrások száma	1,6 \pm 0,9	8,9 \pm 3,1 *	10,3 \pm 1,7	10,3 \pm 2,1
Fejmozgatások száma	12,1 \pm 1,4	9,7 \pm 2,0	17,9 \pm 2,3	20,5 \pm 3,0

A szociális magatartás vizsgálatánál tapasztaltuk a legnagyobb változást. A startbox elhagyása nem volt különböző, de a PACAP6-38-cal kezelt állatok 50%-a nem érte el a célzónát 4 napos korban, szemben a kontroll csoportban mért 25%-kal. 14 napos korban már a legtöbb állat elérte a célzónát, bár ez még mindig kisebb arány volt a PACAP6-38-

cal kezelt csirkékénél. Az az idő, ami alatt elérték az állatok a célzónát, szignifikánsan magasabb volt a PACAP antagonistával kezelt csoportban. Ezenfelül a célzónában töltött idő lényegesen kevesebb volt, mint a kontroll állatoknál. Az E16 napos korban kezelt állatoknál már ilyen különbséget nem tapasztaltunk (**III.4.11. ábra**).



III.4.11. ábra. Runway teszt 4 és 14 napos korban (P4, P14) az E8 kontroll és PACAP6-38-kezelt csoportokban. Az ábra a startbox elhagyási idejét, a célzóna elérését és a célzónában töltött időt mutatja. Átlag \pm SEM. * $P < 0,05$ vs kontroll csoport.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy egyetlen PACAP antagonista kezelés az embrionális kor első felében kismértékű magatartási változásokat okoz, melyek 2 hetes korra eltűnnek. Azonban a kezelés tartós szociális magatartási deficitet eredményez. Az embrionális kor második felében alkalmazott antagonista kezelés nem okozott változást egyetlen mért paraméterben sem.

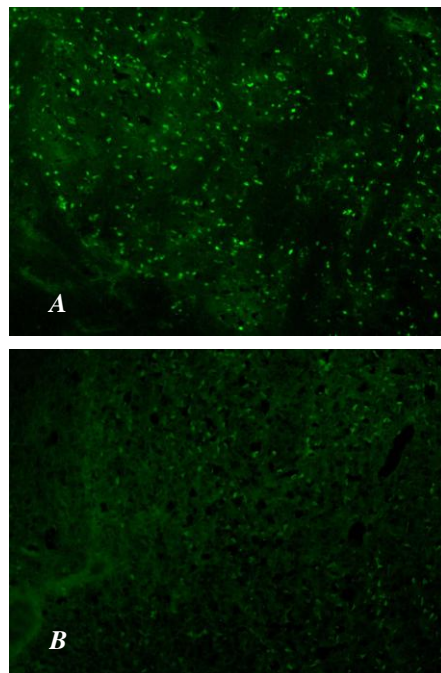
III.5. A PACAP NEUROPROTEKTÍV HATÁSMECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL *IN VIVO* ÉS *IN VITRO*

III.5.1. PACAP antiapoptotikus hatásának vizsgálata *in vivo* stroke modellben TUNEL festéssel

Az icv PACAP kezelés minden vizsgált agyterületen csökkentette a TUNEL-pozitív sejtek számát, szignifikáns csökkenést az infarktus magját képező lateralis és dorsolateralis cortexben, valamint a striatum lateralis részén kaptunk (**III.5.1. táblázat**, **III.5.1. ábra**).

III.5.1. Táblázat. TUNEL-pozitív sejtek száma (átlag \pm SEM) különböző agyterületeken 24 órával az MCAO után. * $P < 0,05$ vs kontroll csoport.

Agyterület	TUNEL-pozitív sejtek száma	
	kontroll	PACAP38
lateralis striatum	55,1 \pm 7,1	26,6 \pm 7,7 *
medialis striatum	29,6 \pm 13,8	15,6 \pm 8,0
lateralis cortex	37,8 \pm 7,0	17,2 \pm 4,5 *
dorsolateralis cortex	36,7 \pm 5,6	16,5 \pm 5,3 *
ventrolateralis cortex	35,6 \pm 5,8	32,6 \pm 6,9
dorsomediális cortex	11,7 \pm 3,8	7,2 \pm 3,8



III.5.1. ábra. Reprezentatív fotók a TUNEL-pozitív neuronokat mutatják a striatum területén egy kontroll (A) és PACAP-pal kezelt (B) állatból.

III.5.2. PACAP molekuláris hatásmechanizmusának vizsgálata *in vivo* glutamát-indukálta retinadegenerációban

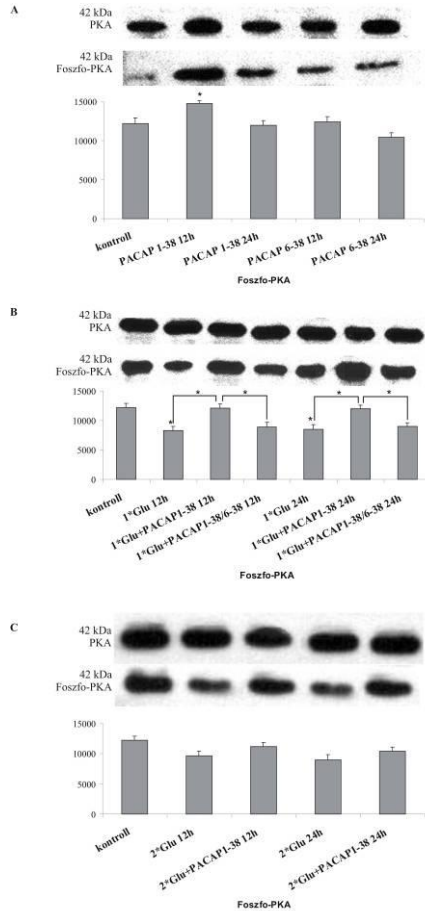
Az intravitrealis PACAP és PACAP6-38 kezelés önmagában is szignifikáns változásokat eredményezett több jelátviteli molekula expressziójában. A PACAP antagonistá kezeléssel jelentősen megemelte a JNK expressziót, a citokróm *c* kiáramlást és a kaszpáz-3 aktivitást, valamint csökkentette a foszfo-Bad expressziót. A PACAP önmagában pedig csökkentette az AIF és a citokróm *c* kiáramlást a mitokondriumból, valamint növelte a PKA foszforilációját.

MSG kezelés hatására az összes vizsgált fehérje változást mutatott. Az MSG kezelés megemelte a foszfo-JNK és az aktív kaszpáz szintjét, különösen 24 óra múlva és a 2. kezelést követően. Az AIF és citokróm *c* kiáramlás minden időpontban emelkedett az MSG kezelés után. A PKA és a Bad foszforilációja, a Bcl-xL és a 14-3-3 fehérje expressziója szignifikánsan csökkent a kezelések után. Az MSG kezelést követő PACAP kezelés az összes MSG-indukálta változást enyhítette. Az ERK1/2 és a CREB foszforilációs szintjében más jellegű változásokat tapasztaltunk. Az egymást követő MSG kezelések folyamatosan növelték mindkét fehérje foszforilációját, amit a PACAP tovább növelt. A 3. MSG kezelést követően a 2. kezeléshez teljesen hasonló fehérjemintázatokat kaptunk. A PACAP6-38 kezelés a PACAP-indukálta változásokat minden esetben gátolta.

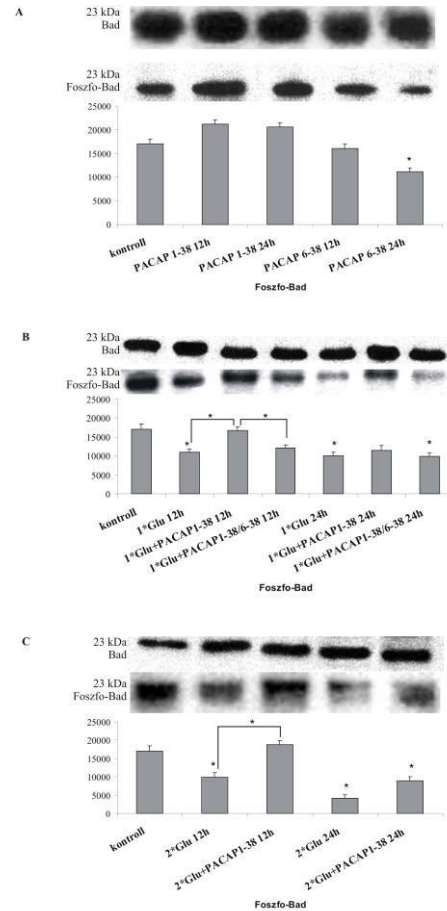
A fent említett jelátviteli utakra gyakorolt PACAP hatást *in vivo* mi írtuk le először, és ezek közül a PKA/Bad/14-3-3 jelátviteli útra gyakorolt hatása a PACAP-nak egyáltalán nem volt ismert korábban *in vitro* sem. Ezért ennek az útvonalnak a leírását részletezem. Önmagában a PACAP növelte a PKA foszforilációját 12 órával a kezelés után, míg a PACAP6-38 nem okozott változást (**III.5.2.A. ábra**). Az *in vivo* MSG kezelések után 12 és 24 óra múlva is szignifikánsan csökkent a PKA foszforilációja, melyet a PACAP ellensúlyozni tudott (**III.5.2.B. ábra**). A PKA foszforilációja nem mutatott további változást a 2. MSG kezelés után (**III.5.2.C. ábra**).

A Bad a Bcl fehérjecsald proapoptotikus tagja, foszforilált állapotban nem képes az antiapoptotikus Bcl-2/Bcl-xL komplexhez kötődni, és inaktiválni azt, így foszforilált állapotban a Bad antiapoptotikus hatású. A Bad Ser112-es foszforilációját a PACAP6-38 kezelés csökkentette 24 óra elteltével (**III.5.3.A. ábra**). Az MSG kezelés után 12 és 24

óra múlva is jelentős csökkentést figyeltünk meg, melyet a PACAP kivédett (**III.5.3.B. ábra**). Hasonló hatást tapasztaltunk a 2. MSG kezelések után (**III.5.3.C. ábra**). A PACAP6-38 kezelés a PACAP hatást mérsékelte mindkét esetben.



III.5.2. ábra. PKA foszforiláció intravitreális PACAP és PACAP6-38 kezelések hatására 12 és 24 órával a kezelés után (A), 1xMSG és PACAP kezelések után 12 és 24 óra elteltével (B) és 2x MSG és PACAP kezelés után 12 és 24 óra múlva (C). * $P < 0,05$ vs kontroll csoport, amennyiben másképp nem jelöltük.

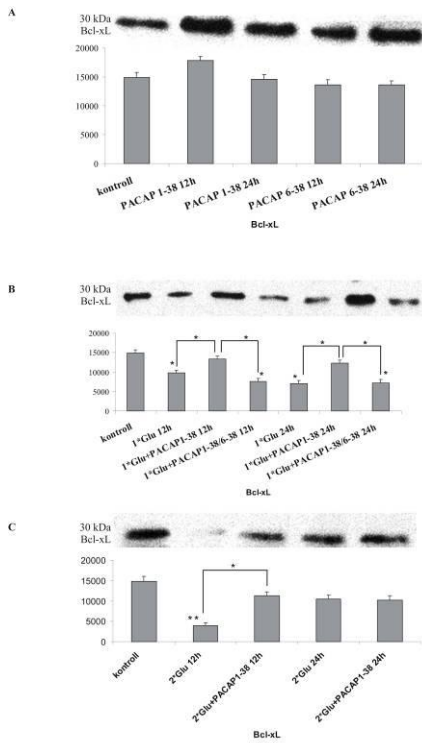


III.5.3. ábra. Bad foszforiláció intravitreális PACAP és PACAP6-38 kezelések hatására 12 és 24 órával a kezelés után (A), 1xMSG és PACAP kezelések után 12 és 24 óra elteltével (B) és 2x MSG és PACAP kezelés után 12 és 24 óra múlva (C). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs kontroll csoport, amennyiben másképp nem jelöltük.

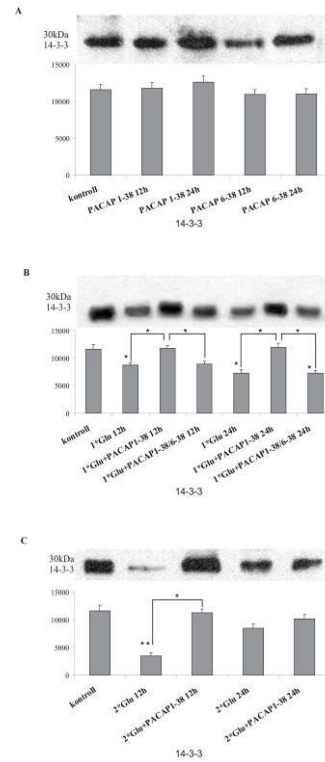
A Bcl-xL szintjét a PACAP önmagában kissé emelte, de ez nem volt szignifikáns, a PACAP6-38-nak pedig semmilyen hatása nem volt (**III.5.4.A. ábra**). Az 1. MSG kezelés után 12 és 24 óra múlva is jelentős csökkenést mértünk. Ezt a PACAP kivédte, az

antagonista kezeléssel együtt pedig a PACAP hatása nem volt megfigyelhető (**III.5.4.B. ábra**). A 2. MSG kezelés után enyhébb, de hasonló hatást tapasztaltunk 12 óra elteltével (**III.5.4.C. ábra**).

A 14-3-3 fehérje expressziójában a PACAP, illetve PACAP6-38 kezelés nem okozott változást (**III.5.5.A. ábra**). Párhuzamosan a Bcl-xL fehérje szintekben megfigyelték, az 1. MSG kezelés után 12 és 24 óra múlva mért erőteljes csökkenést a PACAP kezelés ellensúlyozni tudta (**III.5.5.B. ábra**). A 2. MSG kezelés után hasonló hatás csak 12 óra elteltével volt tapasztalható (**III.5.5.C. ábra**). A PACAP6-38 minden esetben antagonizálta a PACAP hatását.

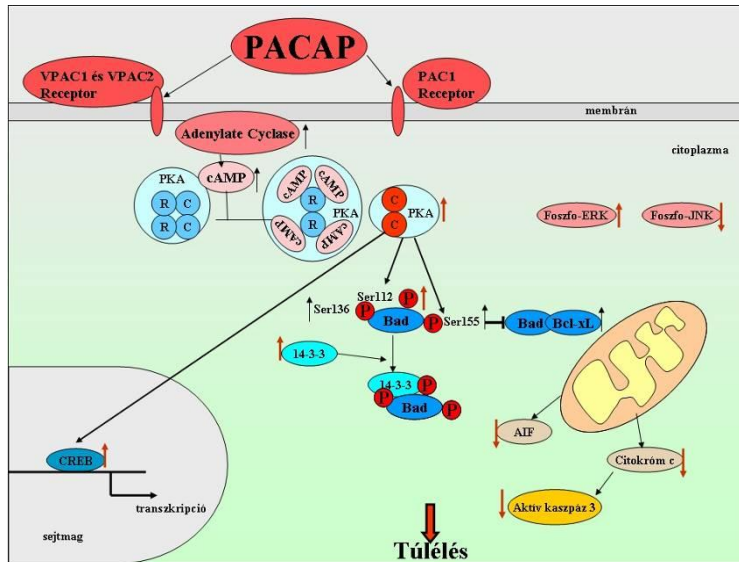


III.5.4. ábra. Bcl-xL fehérje expresszió intravitreális PACAP és PACAP6-38 kezelések hatására 12 és 24 órával a kezelés után (A), 1xMSG és PACAP kezelések után 12 és 24 óra elteltével (B) és 2x MSG és PACAP kezelés után 12 és 24 óra múlva (C). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, vs kontroll csoport amennyiben másképp nem jelöltük.



III.5.5. ábra. 14-3-3 fehérje expresszió intravitreális PACAP és PACAP6-38 kezelések hatására 12 és 24 órával a kezelés után (A), 1xMSG és PACAP kezelések után 12 és 24 óra elteltével (B) és 2x MSG és PACAP kezelés után 12 és 24 óra múlva (C). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs kontroll csoport, amennyiben másképp nem jelöltük.

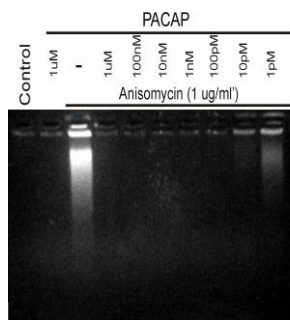
Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a PACAP ellensúlyozza az MSG-okozta változásokat az apoptotikus jelátviteli utakban: A PACAP csökkenti a proapoptotikus fehérjék expresszióját, csökkenti a proapoptotikus szignálmolekulák kiáramlását a mitokondriumból és növeli az antiapoptotikus fehérjék szintjét (**III.5.6. ábra**).



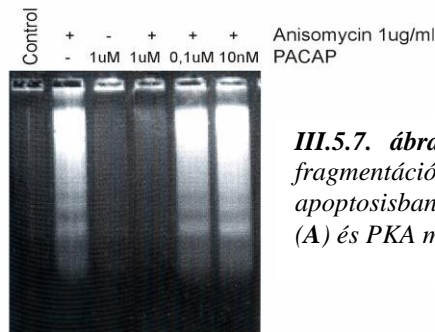
III.5.6. ábra. A PACAP lehetséges *in vivo* molekuláris hatásmechanizmusa retina MSG-okozta károsodásban.

III.5.3. PACAP antiapoptotikus hatásának vizsgálata PC12 sejteken

Az anisomycin, mely erőteljes fehérjeszintézis-gátló szer, jelentős DNS fragmentációt okozott PC12 sejtekben. A PACAP 1 μ M-10pM koncentrációtartományban teljesen meggátolta a DNS fragmentációt, az általunk alkalmazott legkisebb koncentrációban (1pM) pedig csökkentette azt (**III.5.7.A. ábra**). A mutáns PKA-t tartalmazó PC12 sejtvonalon a PACAP csak a legnagyobb koncentrációban (1 μ M) tudta kifejteni ezen hatását, kisebb koncentrációk nem csökkentették a DNS fragmentációt (**III.5.7.B. ábra**).



A



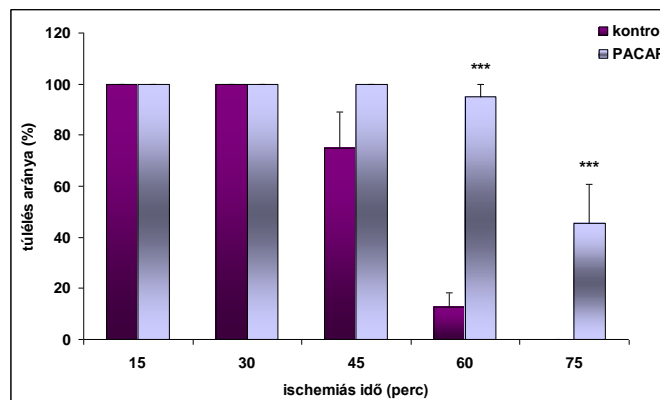
B

III.5.7. ábra. PACAP hatása a DNS fragmentációra anisomycinnel kiváltott apoptosisban vad típusú PC12 sejteken (A) és PKA mutáns PC12 sejteken (B).

III.6. A PACAP NEM NEURONÁLIS HATÁSAINAK VIZSGÁLATA *IN VIVO* ÉS *IN VITRO*

III.6.1. A PACAP nephroprotektív hatásának vizsgálata ischaemiás vesekárosodásban

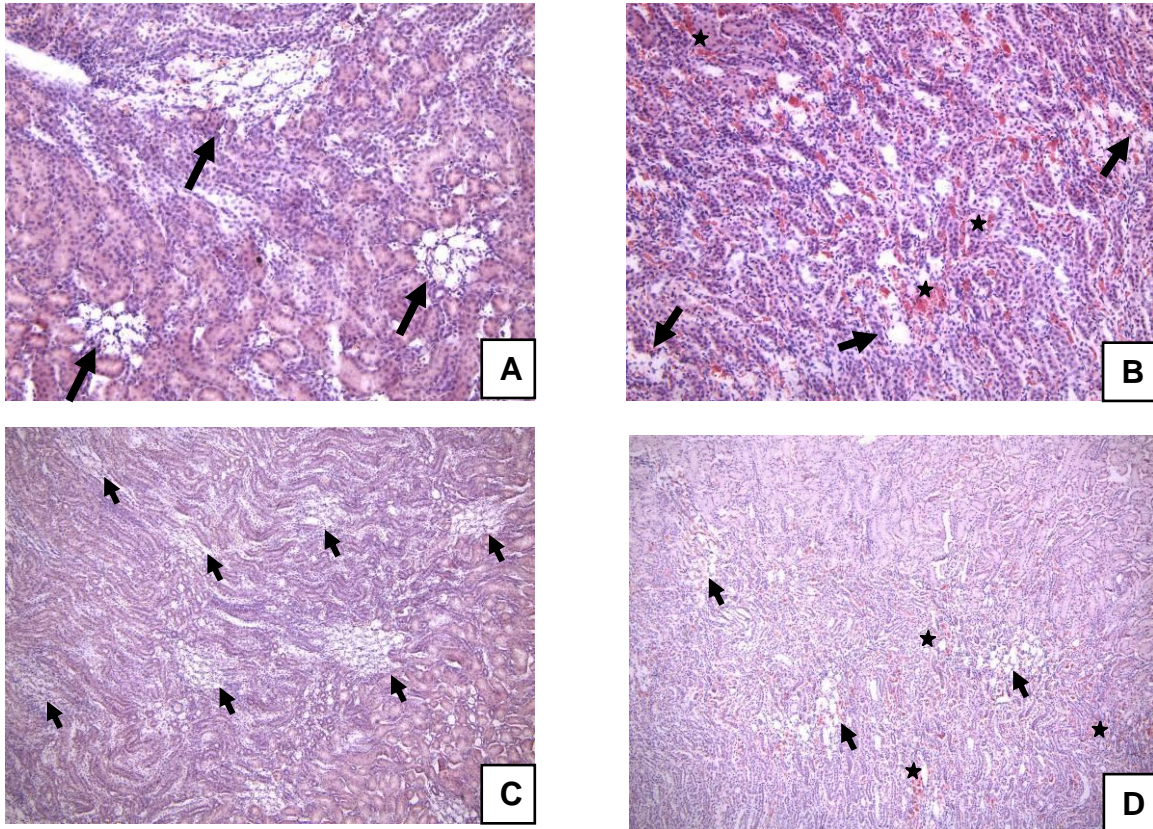
A 15 és 30 perces ischaemiának kitett állatok mindkét csoportban túléltek, míg a többi csoportban a PACAP-pal kezelt patkányok hosszabb ideig túléltek. A 45 perces kezeletlen csoport egyedei 25%-kal rosszabb túlélést mutattak, mint a kísérlet végéig életben maradó PACAP kezelést kapott patkányok. Még erősebb kontrasztot találtunk a 60 perces csoportok között. Itt a kontroll csoportba tartozók mindegyike 1-5 nappal az operációt követően elpusztult, míg a PACAP kezelt állatok 95%-os túlélést mutattak. A 75 perces kezeletlen csoport egyedeit nem tudtuk követni, mert az ischaemia végére vagy azt követően hamarosan elpusztultak. Ezzel szemben a kezelt csoport egyedei 50%-os túlélést mutatva 5-10 nappal a beavatkozást követően pusztultak el (**III.6.1. ábra**).



III.6.1. ábra. Túlélés aránya a kontroll és PACAP-pal kezelt csoportokban a különböző idejű vese ischaemia utáni reperfüziót követően. A 16 napos túlélés (szövettani feldolgozás ideje) reprezentálja a 100%-os túlélést, a többi ennek %-ban kifejezve (átlag \pm SEM). *** $P < 0,001$ vs kontroll csoport.

Szövettani elemzés során azt találtuk, hogy a 15 és 30 perces ischaemiás csoport egyedei az ischaemia ellenére normál szövettani struktúrát mutattak. A 45 perces ischaemiát túlélő kezeletlen állatok Grade I multifokális acut tubularis atrophíát mutattak (**III.6.2.A. ábra**). Ezzel ellentétben a PACAP kezelésben részesült egyedeknél normál vagy nagyon enyhe szövettani elváltozásokat láttunk csak a vesékben (**III.6.2.B. ábra**). A 60 perces kirekesztés Grade II multifokális acut tubularis atrophíát eredményezett a kontroll egyedekben (**III.6.2.C. ábra**). A PACAP kezelést kapott állatokban árnyaltabb fokális

tubularis eltérést észleltünk (**III.6.2.D.ábra**). Az igen korai halálozás miatt a 75 perces kezeletlen csoport szövettanilag nem volt értékelhető. A túlélő, kezelt állatokban súlyos fokális tubularis atrophia alakult ki a túlélés 5-10 napja alatt. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a PACAP csökkentette a mortalitást, és mérsékelte a tubuláris károsodást vese ischaemiás károsodásban.

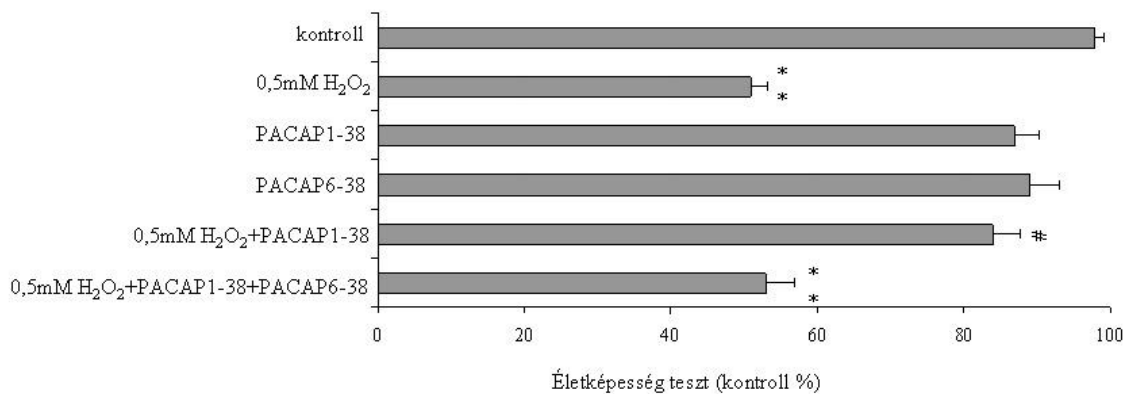


III.6.2. ábra. Vese szövet fénymikroszkópos felvételei, 45 (A, B), ill. 60 perces (C, D) ischaemiát követően kontroll (A, C) és PACAP-pal kezelt (B, D) állatokból, HE-festés. (A) Mérsékelt tubularis atrophia a corticomedullaris határon kp. nagy góciókban megjelenő tubuláris károsodás (nyilak). Az elvékonyodott falú és tág lumenű atrophias tubulusok átmetszetei jól elkülönülnek az ép tubulusok eosinophil, köbhámsejtekkel bélelt, szűk lumenű átmetszeteitől. (B) Minimális tubulusatrophia pangásos jelekkel pangásra utaló tágult kiserek a velőállomány területén (csillagok), elvértve 1-2 kisebb atrophizált tubulus (nyilak). (C) Multifokális tubuláris nekrosis a corticomedullaris határon (nyilak). A tubulusok fala elvékonyodott, lumenük tág. (D) Enyhe fokális tubularis nekrosis (nyilak), pangásos területek (csillagok).

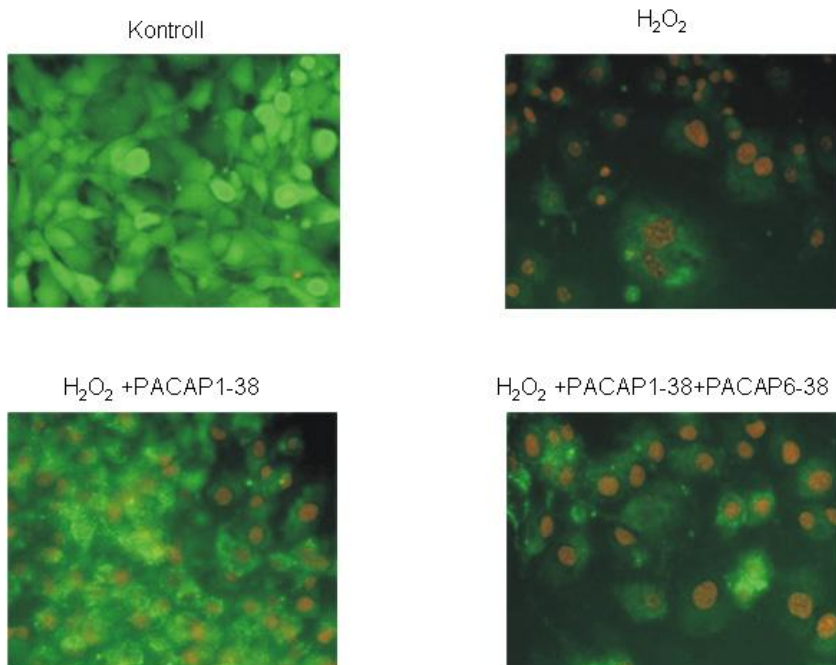
III.6.2. A PACAP hatásának vizsgálata oxidatív stressz indukálta endothelsejt károsodásban *in vitro*

Az endothelsejtek életképességének vizsgálata során MTT teszttel azt találtuk, hogy önmagában a PACAP és PACAP6-38 kezelés nem okozott változást, míg a H₂O₂ kezelést követően szignifikánsan csökkent az életképes sejtek száma a kontroll csoporthoz képest.

Abban a csoportban, ahol H_2O_2 -dal egyidőben PACAP kezelést is alkalmaztunk, szignifikánsan növekedett az életképes sejtek száma. A PACAP6-38 kezelésben is részesült csoportban a PACAP antagonistá képes volt ellensúlyozni a PACAP védő hatását (**III.6.3. ábra**). A PACAP protektív hatását egy további kvalitatív élő/halott teszttel is bizonyítottuk. A H_2O_2 kezelés hatására a halott sejtek száma növekedett, amit a PACAP képes volt kivédeni. A PACAP receptor antagonistá segítségével a PACAP protektív hatása blokkolható volt (**III.6.4. ábra**).

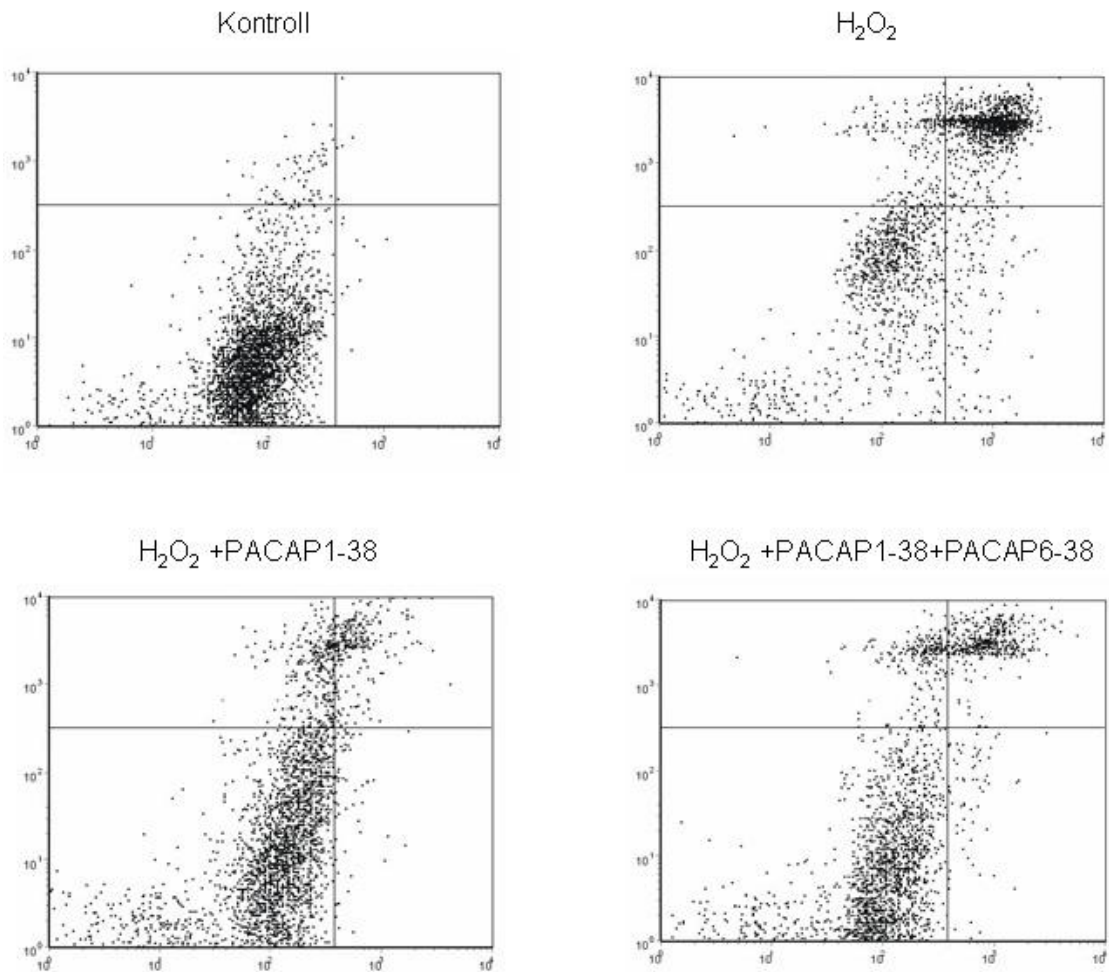


III.6.3. ábra. Endothel sejtek túlélése a kontroll sejtek túléléséhez viszonyítva (átlag \pm SEM) (MTT teszt). ** $P < 0,01$ vs kontroll csoport, # $P < 0,05$ vs H_2O_2 kezelt csoport.

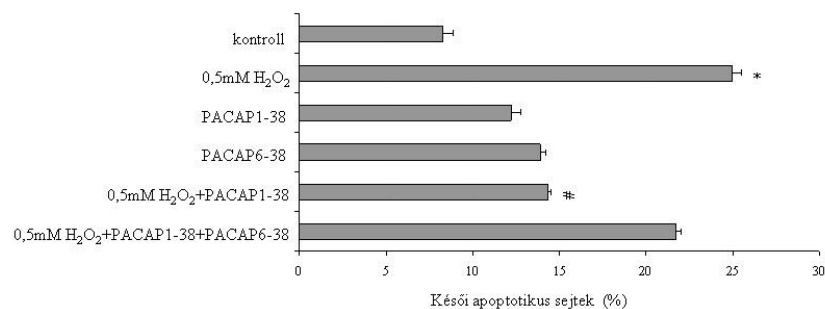
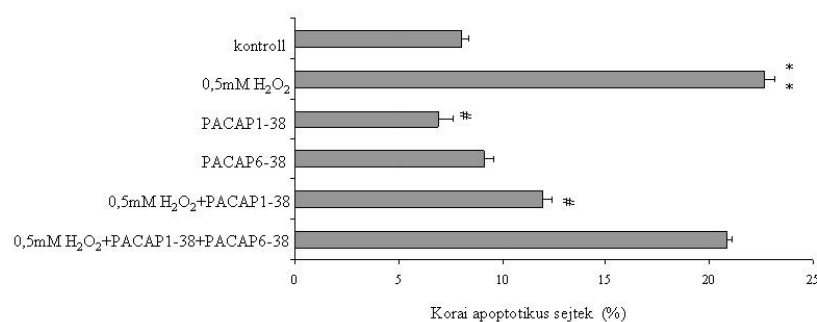
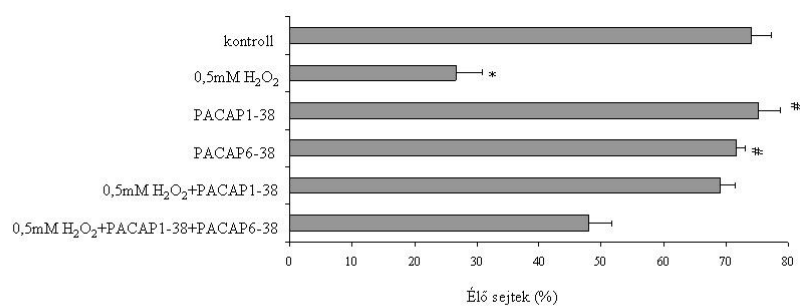


III.6.4. ábra. Reprezentatív fluoreszcens képek a sejtek túléléséről az élő/halott tesztben. A zöld festés az élő sejteket jelöli (calcein-AM), a piros a halott sejteket (ethidium homodimer-1).

Az flow citométerrel kapott eredményeink azt mutatják, hogy a H_2O_2 -kezelt csoportban az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent, míg a késői apoptotikus sejtek száma nőtt a kontroll értékekhez viszonyítva. A PACAP és a PACAP6-38 kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz képest. A H_2O_2 kezeléssel egyidőben történt PACAP szignifikánsan emelte az élő sejtek és csökkentette az apoptotikus sejtek számát. A PACAP védő hatását a PACAP6-38 képes volt megakadályozni (**III.6.5. és 6. ábrák**).



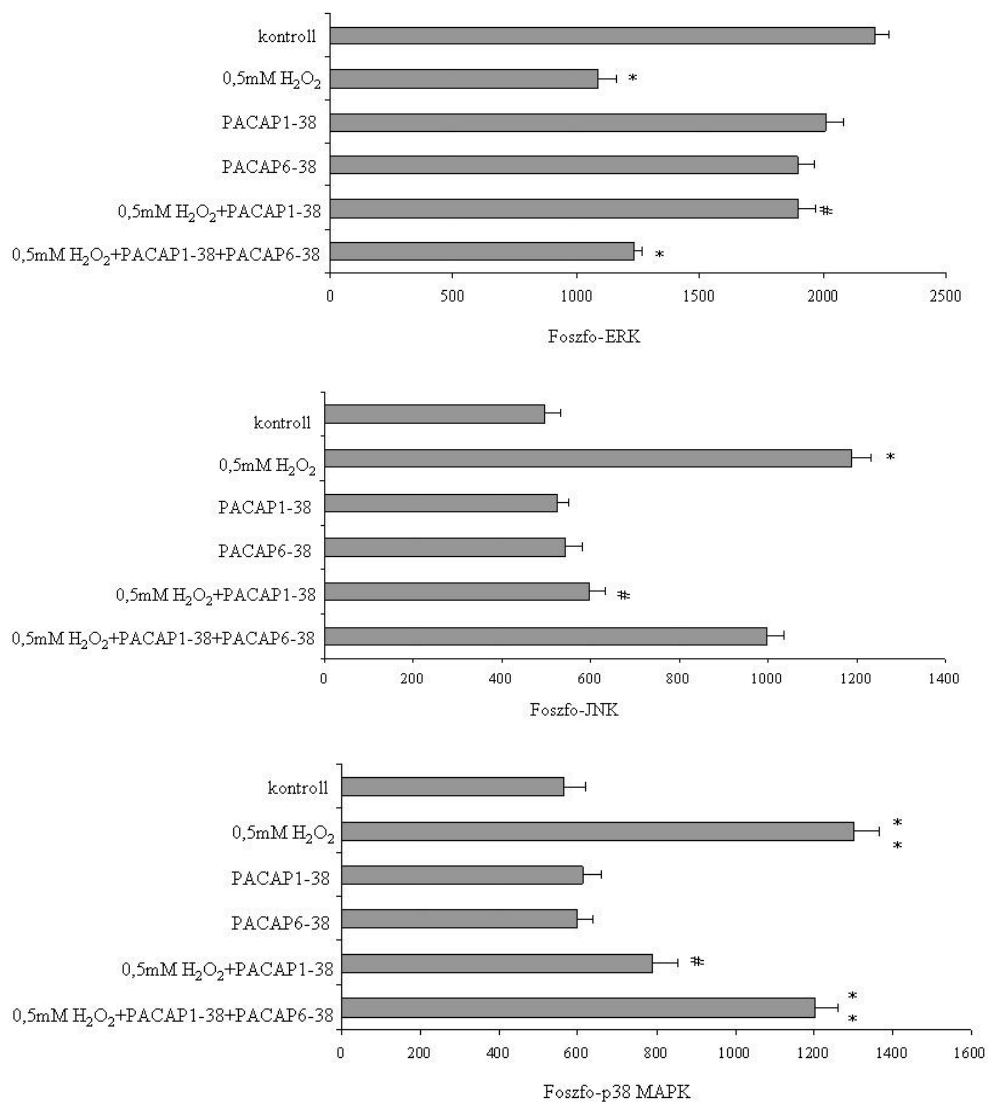
III.6.5. ábra. Flow citometriai analízis az élő, nekrotikus, korai és késői apoptotikus endothelsejtek elkülönítésére különböző kezelések után. Bal alsó kvadráns: egészséges sejtek; jobb alsó kvadráns: korai apoptotikus sejtek; jobb felső kvadráns: késői apoptotikus sejtek; bal felső kvadráns: nekrotikus sejtek.



III.6.6. ábra. Az endothelsejtek túlélésének flow citométerrel kapott eredményeinek számszerű ábrázolása (átlag \pm SEM). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs kontroll csoport, # $P < 0,05$ vs H₂O₂ kezelt csoport.

A MAP kinázok (ERK1/2, p38 MAPK, JNK1/2) foszforilációs szintje a 30. percben érte el csúcspontját. Az ERK foszforilációs szintje csökkent, míg a p38 MAPK és a JNK szintje megemelkedett oxidatív stressz hatására. Sem a PACAP, sem a PACAP6-38 önmagában nem okozott szignifikáns eltérést a vizsgált fehérjék aktivációjában. Azonban H₂O₂ kezelés mellett a PACAP szignifikánsan emelte az ERK és csökkentette a p38 MAPK valamint a JNK foszforilációs szintjét. A PACAP receptor antagonistá csökkentette a PACAP hatását a vizsgált fehérjék esetében (III.6.7. ábra). Összefoglalva

megállapíthatjuk, hogy a PACAP jelentősen csökkentette az endothelsejtek apoptózisát, részben a MAP kinázokon kifejtett hatásaival.



III.6.7. ábra. MAP kinázok foszforilációja különböző kezeléseknek kitett endothelsejtekben (átlag±SEM). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs kontroll csoport, # $P < 0,05$ vs H₂O₂ kezelt csoport.

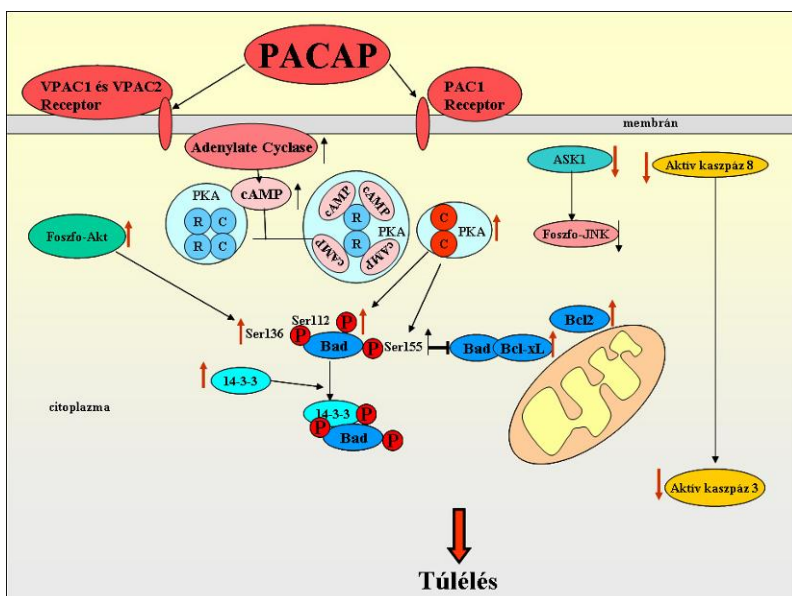
III.6.3. PACAP hatásának vizsgálata oxidatív stressz és ischaemia/reperfúzió indukálta szívizomsejt károsodásban *in vitro*

A szívizomsejtek életképességének vizsgálata MTT teszttel azt mutatta, hogy a PACAP és PACAP6-38 kezelések önmagukban nem okoztak eltérést a kontroll csoporthoz képest, azonban a H₂O₂ kezelés szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét

($58,2 \pm 11,0\%$). PACAP-pal történő együttes inkubáció jelentősen növelte a sejtek életképességét ($85,8 \pm 15,8\%$), amit a PACAP6-38 gátolt ($56,1 \pm 11,9$).

A flow citométerrel kapott eredményeink azt mutatták, hogy a kontroll csoportban az élő sejtek százalékos aránya $90,5 \pm 1,3\%$ volt, míg a korai apoptotikus sejtek $5,4 \pm 1,6\%$ -ban fordultak elő. A H_2O_2 -kezelt csoportban az apoptotikus sejtek száma nőtt ($21,6 \pm 3,8\%$), míg az élő sejtek száma szignifikánsan csökkent ($76,7 \pm 3,6\%$). PACAP és PACAP6-38 kezelés önmagában nem okozott eltérést a kontroll sejtcsoporthoz képest. A H_2O_2 kezeléssel egyidőben történt PACAP kezelés szignifikánsan emelte az élő sejtek ($91,1 \pm 0,9\%$) és csökkentette az apoptotikus sejtek számát ($6,7 \pm 1,7\%$). A PACAP védő hatását a PACAP6-38 megakadályozta (élő sejtek: $81,8 \pm 1,2\%$, apoptotikus sejtek: $14,1 \pm 1,8\%$). A vizsgált pro- és antiapoptotikus jelátviteli útvonalakban, mint aktív kaszpáz-3, AIF, Bcl-2 és foszfo-Bad szintekben a PACAP és PACAP6-38 kezelés önmagában nem idézett elő változást. A H_2O_2 kezelés hatására az AIF és aktív kaszpáz-3 szintje szignifikánsan megemelkedett, míg a Bcl-2 és a foszfo-Bad fehérjék szintje lecsökkent. A PACAP képes volt ellensúlyozni a H_2O_2 -indukálta változásokat, ami PACAP6-38 és PACAP együttes kezelés esetén nem következett be.

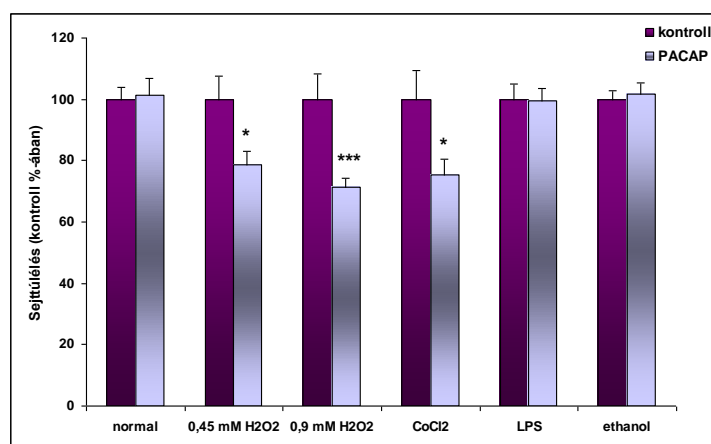
Az *in vitro* ischaemia/reperfúzió-indukálta károsodásban hasonló protektív hatást tapasztaltunk: a PACAP kezelés jelentősen megnövelte a sejtek életképességét, csökkentve az apoptotikus sejtek számát. A jelátviteli utakat tanulmányozva azt az eredményt kaptuk, hogy az ischaemia/reperfúzió szignifikánsan csökkentette a PKA, Akt és Bad foszforilációját, amit a PACAP ellensúlyozott, míg a PACAP6-38 jelenlétében a protektív hatás megszűnt. A 14-3-3 és a Bcl-xL fehérjék expressziója jelentősen csökkent ischaemia/reperfúzió hatására, míg a kaszpáz-3 aktivitás megnőtt. Ezeket a proapoptotikus folyamatokat is gátolta a PACAP, míg az antagonista megszüntette a PACAP hatásait. Tekintve, hogy a szívizomsejtekben kapott eredmények részletes leírása egy korábbi doktori értekezésben már szerepelt (Gallyas, 2007), az eredményeket itt csak egy összefoglaló ábrán mutatom be (**III.6.8. ábra**).



III.6.8. ábra. A PACAP lehetséges *in vivo* molekuláris hatásmechanizmusa szívizom-sejt károsodásban.

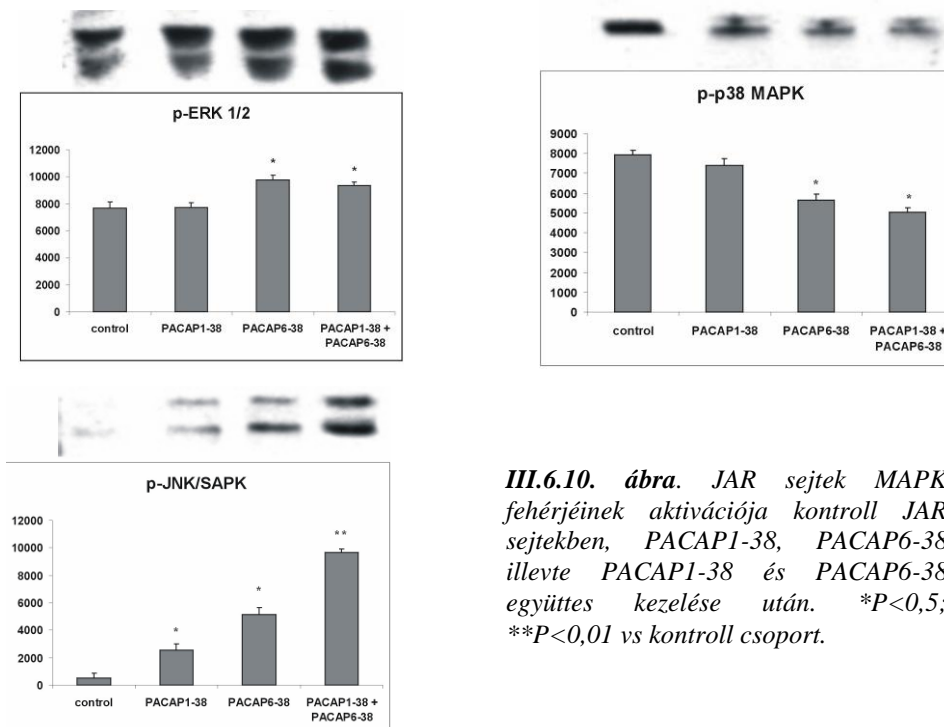
III.6.4. A PACAP hatásának vizsgálata trophoblast sejtek túlélésére és jelátviteli útvonalaira

A PACAP kezelés önmagában nem befolyásolta a JAR sejtek túlélését. A H_2O_2 kezelés dóziszfüggően csökkentette a sejttúlélést, azonban ezt a PACAP-pal való együttes kezelés nem növelte, hanem tovább csökkentette. Hasonló eredményt kaptunk a $CoCl_2$ -al előidézett *in vitro* hypoxiában is: a PACAP együttes alkalmazása további sejtpusztuláshoz vezetett. A PACAP nem befolyásolta a LPS és ethanol sejttúlélésre kifejtett csökkentő hatását (**III.6.9. ábra**).



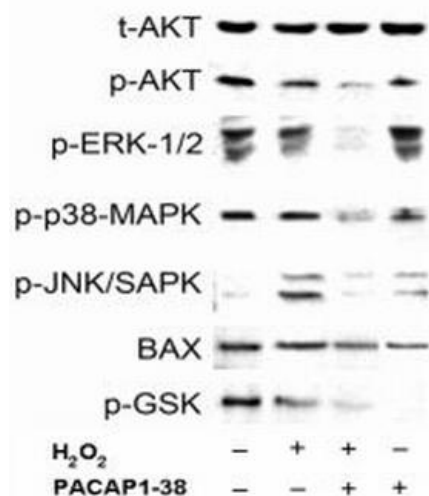
III.6.9. ábra. PACAP hatása a JAR sejtek túlélésére különböző károsító ingereknek kitéve, a kontroll sejtek túlélési %-ában megadva (átlag \pm SEM). * $P < 0,5$; *** $P < 0,001$ vs kontroll csoport.

A choriocarcinoma sejtek jelátviteli molekuláit vizsgálva azt találtuk, hogy a PACAP önmagában növelte az ERK és JNK foszforilációt, míg csökkentette az Akt, p38 MAPK és GSK foszforilációt és a Bax expressziót. Meglepő módon a PACAP receptor antagonistával kezelt csoportban hasonló változásokat észleltünk: a JNK és ERK foszforiláció növekedett, míg a p38 MAPK foszforiláció csökkent. A két peptid együttes alkalmazásánál pedig a változások még kifejezettebbek voltak, különösen a JNK foszforilációja növekedett tovább (**III.6.10. ábra**).



III.6.10. ábra. JAR sejtek MAPK fehérjéinek aktivációja kontroll JAR sejtekben, PACAP1-38, PACAP6-38 illetve PACAP1-38 és PACAP6-38 együttes kezelése után. * $P < 0,5$; ** $P < 0,01$ vs kontroll csoport.

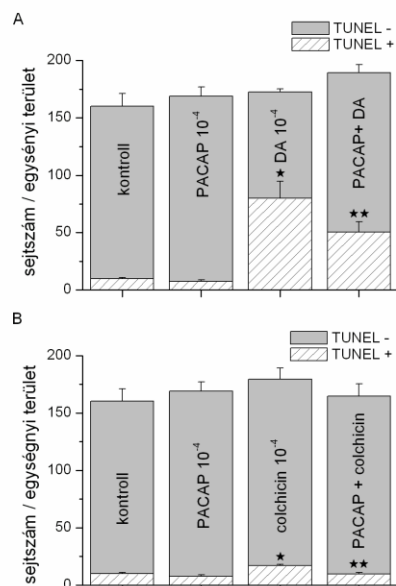
Oxidatív stressz hatására a JNK foszforiláció növekedett, az Akt, ERK, GSK foszforiláció csökkent és a p38 MAPK foszforiláció valamint a Bax expresszió nem változott. H_2O_2 és PACAP együttes kezelés mellett a PACAP tovább csökkentette az összes vizsgált fehérje expresszióját. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a PACAP hatása trophoblast sejtekben eltérő az eddig vizsgált más sejttípusoktól, miszerint nem fokozza a sejtek túlélését, sőt, potenciórozza az oxidatív stressz és *in vitro* hypoxia káros hatásait. Továbbá, ellentétben az eddig vizsgált sejtekkel, a PACAP6-38 nem antagonistaként, hanem agonistaként viselkedett a trophoblast sejtekben (**III.6.11. ábra**).



III.6.11. ábra. A jelátviteli fehérjék reprezentatív western blotjai kezeletlen, H₂O₂- és PACAP-kezelt JAR sejtekben.

III.6.6. PACAP antiapoptotikus hatása *Helix pomatia* nyálmirigyében

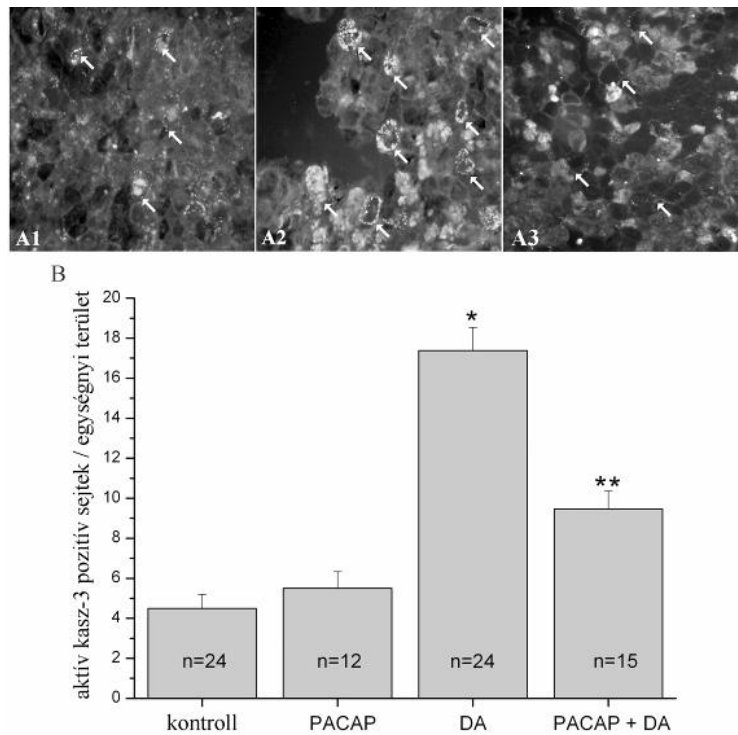
A *Helix* nyálmirigy dopaminnal, illetve colchicinnel való kezelése jelentősen emelte a TUNEL-pozitív apoptotikus sejtek számát. A PACAP előkezelés önmagában nem befolyásolta ezt, azonban szignifikánsan csökkentette a dopaminnal és colchicinnel kiváltott apoptózist (**III.6.12. ábra**).



III.6.12. ábra. PACAP hatása a dopamin (A) és a colchicin (B) által stimulált apoptózisra a *Helix pomatia* nyálmirigyében. Átlag TUNEL-pozitív és negatív sejtszám \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs kontroll csoport.

Hasonló hatást mutatott a kaszpáz-3 immunjelölés is. Dopamin kezelés hatására jelentősen emelkedett a kaszpáz-3 pozitív sejtek száma. PACAP kezelés önmagában nem változtatta meg a kontroll mirigyekben meglévő kaszpáz aktivitást, azonban a dopamin-indukálta aktivitás növekedést jelentős mértékben csökkenteni tudta (**III.6.13. ábra**).

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a PACAP antiapoptotikus hatása egy gerinctelen szervezetben is érvényesül, tehát egyike lehet a peptid ősi biológiai hatásainak.



III.6.13. ábra. Reprezentatív kaspáz-3 immunfestett metszetek kontroll (A1), dopamin (A2) és dopamin+PACAP (A3)-kezelt nyálmirigyekből. A nyilak a pontozott kaspáz jelölődést mutatják. (B) A PACAP hatása az aktív kaspáz-3 jelölődésre egységni területenkénti sejtszámban megadva (átlag \pm SEM). * $P < 0,05$ vs kontroll csoport, ** $P < 0,05$ vs dopamin-kezelt csoport.

IV. MEGBESZÉLÉS

Jelen értekezésben bemutatásra kerültek az utóbbi 10 év munkájából született eredmények, melyek túlnyomórészt a PACAP neurotrophicus és neuroprotektív hatását igazolják *in vitro* és *in vivo* körülmények között. Kimutattuk, hogy a PACAP jelentős neuroprotektív hatással rendelkezik stroke, Parkinson-kór, Huntington-chorea, és retinadegenerációs modellekben (III.1., 2., 3. fejezetek). Igazoltuk, hogy a PACAP gyorsítja az idegrendszeri fejlődést *in vivo*, és csökkenti a glutamát kezelés káros fejlődéstani hatásait (III.4. fejezet). A peptid neuroprotektív hatásmechanizmusával kapcsolatban igazoltuk az *in vivo* is érvényesülő antiapoptotikus hatást, melyben szerepet játszik a proapoptotikus jelátviteli utak gátlása és az antiapoptotikus jelátviteli molekulák serkentése (III.5. fejezet). Igazoltuk továbbá a peptid citoprotektív hatását szívizom-, és endothelsejtekben, illetve nyálmirigyben *in vitro*, valamint vese ischaemiában *in vivo* (III.6. fejezet). Vizsgáltuk több, a PACAP hatását potenciálisan befolyásoló tényezőt, mindeközben pedig számos észrevételt tettünk az általunk alkalmazott *in vivo* modellekben. Részletesen vizsgáltuk a funkcionális tesztek és ezek alkalmazhatóságát a PACAP stroke modellben kifejtett neuroprotektív hatásának megítélésében (III.1. fejezet), továbbá igazoltuk, hogy Parkinson-kór modellben a PACAP neuroprotektív hatása a kortól és nemtől függ (III. 2. fejezet). Részletesen leírtuk az újszülött patkányok idegrendszeri fejlődését toxikus, hypoxiás károsodásban és PACAP hatására, valamint, hogy a glutamát fejlődést késleltető hatását a PACAP kezelés ellensúlyozza (III.4. fejezet). Továbbá kimutattuk, hogy egyes esetekben, mint pl. trophoblast sejtekben a PACAP széles körben alkalmazott antagonistája, a PACAP6-38, nem antagonistaként viselkedik, és a PACAP a sejttúlélést - ellentétben más sejtekkel -, csökkenti (III.6. fejezet). Mindez indokoltá teszi, hogy a PACAP hatását különböző sejteken vizsgáljuk. Az alábbi fejezetekben áttekintést nyújtok a PACAP neurotrophicus, neuroprotektív és általános citoprotektív hatásairól, beleillesztve eredményeinket a tudomány mai állása szerinti ismeretanyagba.

A PACAP *IN VIVO* NEUROPROTEKTÍV HATÁSAI

A PACAP *in vivo* neuroprotektív hatásával kapcsolatban munkánkat megelőzően csak néhány adat állt rendelkezésre, nevezetesen, hogy a PACAP szisztémás adása csökkenti a hippocampális neuronpusztulást globális ischaemiában, illetve a kolinerg sejtek pusztulását a fornix átvágásakor (Takei et al., 2000; Uchida et al., 1996). Kísérleteinkben igazoltuk, hogy a PACAP-nak protektív hatása van fokális agyi ischaemiában, Parkinson-kór és Huntington-chorea *in vivo* modellekben, valamint ischaemiás és toxikus retinadegenerációban (III.1., 2., 3. fejezetek). Igazoltuk, hogy a poszttraumás PACAP kezelés csökkenti a diffúz axonális károsodást két különböző neurotrauma modellben is, azonban ezen témakör nem képezi a dolgozat alapját (Farkas et al., 2004; Kövesdi et al., 2007, 2008; Tamás et al., 2006). Eredményeinket követően számos kutatócsoport tovább vizsgálta és igazolta ezen hatásokat. Hasonló neuroprotektív hatást írt le Stumm és munkacsoportja fokális ischaemiában (Stumm et al., 2007), ahol jelentős PACAP-szint emelkedést is találtak. Két külön munkacsoport is kimutatta, hogy az infarktus nagysága és a neurológiai deficit fokozottabb PACAP KO egerekben, mely PACAP adással csökkenthető (Chen et al., 2006; Ohtaki et al., 2006). Ez utóbbi munkacsoport legújabb összefoglaló tanulmányában számos helyen hivatkozik eredményeinkre és megerősíti azokat (Ohtaki et al., 2008). Igazolták, hogy a PACAP *in vivo* csökkenti a proapoptotikus szignáltranszdukciós molekulák expresszióját számos agyterületen (Chen et al., 2006; Dohi et al., 2002; Ohtaki et al., 2006). Traumás sérülésekben a PACAP csökkenti a gerincvelő károsodását és a PACAP expresszió növekedik humán agyi sérülésekben (Chen and Tzeng, 2005; van Landeghem et al., 2007). Egér MPTP-indukálta Parkinson-kór modellben, szisztémás PACAP kezeléssel is igazolták az általunk kapott eredményeket (Wang et al., 2008). Ugyancsak új irodalmi adat, hogy egérben methamphetamin-indukálta striatális sejtpusztulást is képes a PACAP csökkenteni (Guillot et al., 2008). A PACAP retinoprotektív hatásával kapcsolatban is születtek újabb eredmények: nervus opticus átvágásánál és kainát-indukálta lézióban a PACAP védő hatással bír (Seki et al., 2006, 2008). Számos összefoglaló közlemény jelent meg a PACAP neuroprotektív hatásaival kapcsolatban (Brenneman, 2007; Dejda et al., 2005,

2008; Ohtaki et al., 2008; Rácz et al., 2006, Shioda et al., 2006; Somogyvari-Vigh és Reglődi, 2004).

A PACAP NEUROPROTEKTÍV HATÁSMECHANIZMUSA

Az általunk tanulmányozott *in vivo* modellekben számos károsító hatás együttesen játszik szerepet a neuronpusztulásban. Agyi ischaemiában, toxikus lézióval kiváltott neurodegeneratív modellekben, valamint a retina ischaemiás és toxikus károsodásban egyaránt szerepet játszik a glutamát excitotoxicitás, az oxidatív stressz, valamint az ezzel összefüggő szabad gyökök okozta károsodás, továbbá a fokozott microglia reakció, mely másodlagos gyulladásos folyamatokon keresztül súlyosbítja a neuronális degenerációt (Ábrahám et al., 2003; Kopper és Fésüs, 2002; Leker és Shohami, 2002; Lipton, 1999; Osborne et al., 2004; Sucher et al., 1997; Vidal-Sanz et al., 2000). Az ilyen komplex mechanizmusú károsodásoknál nem meglepő, hogy több ezer különböző potenciális neuroprotektív molekulával próbálkoznak, melyek a degenerációhoz vezető kaszkád egyes lépéseibe beavatkozni képesek (Beresford et al., 2003). Irodalmi adatok és saját vizsgálataink alapján a PACAP azért előnyös molekula, mert több útvonalba is egyszerre beavatkozik. Ezek közül különösen fontos az antiapoptotikus és antiinflammatorikus hatás. Az alábbi fejezetekben összefoglalom a kísérleteinkben is vizsgált, feltételezetten szerepet játszó faktorokat, melyek hozzájárulnak a PACAP igen jelentős neuroprotektív hatásához.

A PACAP protektív hatása különböző károsító ágensekkel szemben

A fent említett komplex mechanizmusok egymásra hatva és kaszkádfolyamatokat elindítva vezetnek végül neurodegenerációhoz *in vivo*. A PACAP védő hatását számos, *in vivo* toxicitásban is szerepet játszó faktorról szemben kimutatták. Igazolódott, zömmel *in vitro* kísérletekben, hogy a PACAP védi a neuronokat többek között glutamát, ethanol, oxidatív stressz, ceramid, beta-amiloid protein, HIV burokfehérje és 6-OHDA toxicitással szemben. Ezen hatásokat a **IV.1. táblázat**ban foglaltam össze, ahol az irodalmi hivatkozás is megtalálható. Saját kísérleteink bővítették ezt a listát, hiszen kimutattuk, hogy a PACAP protektív hatással rendelkezik *in vitro* hypoxiában a retina horizontális sejtjeiben,

valamint a fehérje szintézist gátló anisomycinnel szemben PC12 sejtekben. Továbbá, a PACAP jelentős antiapoptotikus hatást mutatott oxidatív stressz indukálta endothel- és szívizomsejtkárosodásban és *in vitro* hypoxia/ischaemia-indukálta szívizomsejtkárosodásban (III.3., 5., 6. fejezetek).

IV.1. táblázat. Összefoglalás a PACAP különböző *in vitro* károsító behatásokkal szembeni protektív hatásáról (saját eredmények kiemelve)

Károsító hatás	Sejt- és szövettípus	Irodalom
Beta amiloid protein	PC12 sejtek	<i>Onoue et al., 2002b</i>
Ceramid	PC12 sejtek	<i>Hartfield et al., 1998</i>
	Kisagyi szemcsesejtek	<i>Vaudry et al., 2003</i>
Cisplatin	Kisagyi szemcsesejtek	<i>Aubert et al., 2008</i>
Colchicin	Helix nyálmirigy	<i>Pirger et al., 2008</i>
Ethanol	Kisagyi szemcsesejtek	<i>Bhave és Hoffman, 2004; Vaudry et al., 2002b</i>
Glukokortikoid	T-lymphocyt	<i>Delgado et al., 1996</i>
Glutamát	Retina kultúra	<i>Shoge et al., 1999</i>
	Kortikális neuronok	<i>Morio et al., 1996; Shintani et al., 2005</i>
	PC12 sejtek	<i>Said et al., 1998</i>
HIV burokfehérje	Hippocampális neuronok	<i>Arimura et al., 1994</i>
<i>In vitro</i> hypoxia/reperfúzió	Szívizomsejtek	<i>Rácz et al., 2008</i>
Ionicin	Kortikális neuronok	<i>Skoglosa et al., 1999</i>
Lipid peroxidáció	Kisagyi szemcsesejtek	<i>Ito et al., 1999</i>
LPS	Kortikális neuron/glia kultúra	<i>Kong et al., 1999; Li et al., 2005</i>
Mitochondriális complex I inhibitor	PC12 sejtek	<i>Wang et al., 2005</i>
NO	PC12 sejtek	<i>Onoue et al., 2002a</i>
6-OHDA	Mesencephalicus dopaminerg sejtek	<i>Takei et al., 1998</i>
Oxidatív stressz (H ₂ O ₂)	Kisagyi szemcsesejtek	<i>Vaudry et al., 2002c</i>
	Endothelsejtek	<i>Rácz et al., 2007</i>
	Szívizomsejtek	<i>Gasz et al., 2006a,b</i>
NGF megvonás	PC12 sejtek	<i>Tanaka et al., 1997</i>
	Sympathicus neuroblastok	<i>Chang és Korolev, 1997; Chang et al., 1996; Przywara et al., 1998</i>
	DRG neuronok	<i>Lioudyno et al., 1998</i>
Nitroprussid natrium	Kortikális neuronok	<i>Sanchez et al., 2008, 2009</i>
Prion protein fragmens	PC12 sejtek	<i>Onoue et al., 2002c</i>
Protein szintézis gátlás anisomycinnel	PC12 sejtek	<i>Reglődi et al., 2004</i>
Streptozotocin	Pancreas beta sejtek	<i>Onoue et al., 2008</i>
Szérum megvonás	Kisagyi szemcsesejtek	<i>Canonico et al., 1996; Chang et al., 1996; Gonzalez et al., 1997; Kienlen-Campard et al., 1997</i>
	Ovariális folliculus sejtek	<i>Lee et al., 1999</i>
TGF beta	Hypophysis adenoma sejtek	<i>Oka et al., 1999</i>
Trombin	Kortikális neuronok	<i>Sanchez et al., 2009</i>

Az excitotoxikus hatásról, mely központi szerepet játszik az összes vizsgált neuropathológiai elváltozásban, bővebb magyarázattal szolgálok az alábbiakban. A glutamát, mely a fő excitátoros neurotranszmitter az idegrendszerben, rendkívül szigorúan szabályozott koncentrációtartományban működik. A felszabaduló glutamátot

glutamát transzporter rendszerek takarítják el a szinaptikus részből, melyek közül a GLAST/EAAT1 és GLT-1/EAAT2 rendszerek a gliasejtekben lokalizálódnak, míg a többi a neuronokra jellemző. Az astrocitáknak nagyon fontos szerepe van ebben a glutamát-reuptake folyamatban és a glutamin szintetáz enzimén keresztül a glutamát átalakításában. Abban az esetben, ha a sejtek túlzott glutamát koncentrációnak vannak kitéve, akár a fokozott felszabadulás, akár a reuptake rendszer zavara miatt, az NMDA és AMPA receptorok aktiválásán keresztül túlzott Ca^{2+} és K^{+} felszabadulás következik be, citotoxikus ödéma lép fel, nő az oxidatív stressz, és aktiválódnak a sejtpusztító folyamatok. A glutamát excitotoxikus szerepét számos idegrendszeri kórképben igazolták, mint stroke, traumás agykárosodás, neurodegeneratív betegségek és epilepszia. A PACAP glutamát toxicitással szembeni védő hatását több sejtvonalon kimutatták *in vitro*. Retina kultúrában (Shoge et al., 1999) és kortikális neuronokban (Morio et al., 1996) a PACAP igen széles koncentrációtartományban nyújt védelmet. Kimutatták, hogy a PACAP fokozza a glutamát reuptake mechanizmust gliasejtekben, fokozza a glutamát transzporterek és a gliális glutamin szintetáz expresszióját (Figiel és Engele, 2000). A PACAP glutamát toxicitás elleni védő hatását mi is igazoltuk *in vivo* kísérleteinkben: egyrészt mindegyik komplex degenerációs folyamatban szerepet játszik az excitotoxikus hatás, másrészt glutamát-indukálta retinadegenerációban közvetlenül is igazoltuk ezen védő hatást (III.3. fejezet). A PACAP az újszülöttkori glutamát kezelés fejlődést késleltető hatását is részben ellensúlyozta (Kiss et al., 2006). Más kísérleteinkben kimutattuk, hogy a PACAP a kainát excitotoxikus hatása ellen is képes védő hatást kifejteni (Atlasz et al., 2006). Ezenfelül, eredményeink további kísérletek alapját is képezik, hiszen az MSG- és BCCAO-indukálta retinadegeneráció standardizálásával számos egyéb neuroprotektív szer vagy módszer vizsgálata válik lehetővé, mint ahogy azt a közelmúltban a diazoxiddal, továbbá az ingergazdag környezettel kapcsolatban kimutattuk (Atlasz et al., 2007; Szabadfi et al., 2009).

A PACAP neuronális antiapoptotikus hatásai

A PACAP legtöbbet tanulmányozott hatása az antiapoptotikus hatás, mely fő szerepet játszik a neuronális védelemben. A sejttúlélést elősegítő, antiapoptotikus hatás hátterében igen komplex mechanizmusok állnak (Kopper és Fésüs, 2002). A PACAP hatását több

összefoglaló közleményben is leírták (Botia et al., 2007; Dejda et al., 2008; Falluel-Morel et al., 2007; Li et al., 2005; Ravni et al., 2006; Waschek, 2002), (**IV.1. táblázat**). Elsőként kisagyi szemcsesejteken mutatták ki a PACAP sejttúlélést fokozó hatását (Canonico et al., 1996). Később kimutatták, hogy ez a hatás a PAC1 receptorok aktivációján keresztül valósul meg, leghatásosabban 1-100nM-os koncentrációban. A mechanizmus legtöbb esetben a cAMP/PKA/MAPK útvonal aktiválásával történik, mely végül az apoptózist kiváltó kaszpáz-3 csökkenéséhez vezet (Vaudry et al., 2000b). Azonban a PACAP más jelátviteli utakat is aktivál (ld. később). Számos más neuronális sejttypusban és különböző károsító ágenssel szemben is igazolták a PACAP sejttúlélést fokozó hatását. Például kimutatták, hogy a PACAP fokozza a túlélést kolinerg neuronokban (Yuhara et al., 2001), hátsó gyöki ganglionsejteken (Lioudyno et al., 1998), ganglion ciliare-ban (Pugh és Margiotta, 2000) és PC12 sejtekben (Tanaka et al., 1997). A PACAP rövid idő alatt képes hatását kifejteni, és olyan jelátviteli utakat aktiválni, mely hosszan tartó védelmet biztosít. Ezt először ugyancsak szemcsesejteken mutatták ki, ahol 1 órás PACAP kezelés már maximális protektív hatást fejtett ki, mely hosszabb kezelési időkkal nem volt növelhető (Vaudry et al., 1998). Ennek hátterében korai génaktivációs mechanizmusok állhatnak (Vaudry et al., 1998). Ezt a hatást mi *in vivo* is igazoltuk, ugyanis 7 napig tartó előkezelés nem tudta tovább növelni a védő hatást, a fokális ischaemiát közvetlenül megelőző kezeléssel szemben (Reglődi et al., 2002). Ugyancsak ezt erősíti az *in vivo* glutamát-indukálta retinadegenerációban nyújtott PACAP védelem: a kétszeri kezeléssel kapott neuroprotektív hatás nem volt tovább növelhető többszöri PACAP kezelésekkal (Babai et al., 2005, 2006; Rácz et al., 2006).

A PACAP túlélést fokozó hatása nem-neuronális sejtekben/szövetekben

Már korábban ismert volt, hogy a PACAP antiapoptotikus és sejttúlélést fokozó hatása nem korlátozódik neuronális sejtekre. Protektív, illetve proliferatív hatást írtak le hypophysis, colon, tüdő és prostata tumorsejteken (Gutierrez-Canas et al., 2003; Le et al., 2002; Oka et al., 1999; Zia et al., 1995), ovariális folliculus sejtekben (Lee et al., 1999), T-lymphocytákban (Delgado és Ganea, 2000a,b, 2001). Ezen sejtek/szövetek körét bővítették eredményeink. Kimutattuk, hogy a PACAP serkenti a sejtek túlélését oxidatív stresszel szemben és ischaemia/reperfúziós károsodásban szívizomsejteken, valamint

oxidatív stressz-indukálta endothelsejt károsodásban a proapoptotikus jelátviteli utak gátlásával, és az antiapoptotikus utak serkentésével (III.6. fejezet). Továbbá kimutattuk, hogy a PACAP egy gerinctelen szervezetben (*Helix pomatia*) is képes antiapoptotikus hatást kifejteni (Pirger et al., 2008), mely arra utalhat, hogy ezen hatása a filogenezis során megőrződött, és egy alapvető PACAP hatást reprezentál (IV.1. táblázat). *In vivo* további szervezetekben is kimutattuk a PACAP védő hatását. Vese ischaemiás károsodásban igazoltuk, hogy a PACAP kezelés növeli az állatok túlélését és csökkenti a tubuláris károsodást (Szakály et al., 2008). Az értekezés részét nem képező tanulmányunkban pedig leírtuk, hogy a PACAP vékonybél ischaemiás károsodásban is védő szereppel bír (Ferencz et al., 2009).

Mindezen megfigyeléseink zömmel új adatokat szolgáltatnak a PACAP általános citoprotektív hatásaival kapcsolatban. A szívizomsejtekben a PACAP-nak számos hatása ismert volt korábban is, mint pl. a cardiális excitabilitásra, coronaria keringésre, atriális natriuretikus faktor termelésre és szívritmusra kifejtett hatásai (Hirose et al., 2001; Parsons et al., 2000). Ezen hatások a mai napig is az érdeklődés középpontjában állnak, és számos cikk jelent meg az utóbbi időben ezzel kapcsolatban (Girard et al., 2007; Tompkins és Parsons, 2008). Azonban a PACAP szívizomsejtek túlélését elősegítő, antiapoptotikus hatása korábban nem volt ismert. Ezt mi oxidatív stressz- és *in vitro* ischaemia/reperfúzió-indukálta károsodásokban is igazoltuk. Legújabb adataink szerint a PACAP-nak az ischaemiás prekondicionáláshoz hasonló mértékű védő hatása van (Róth et al., 2009).

A PACAP endothelsejteken kifejtett hatásáról igen kevés adat áll jelenleg rendelkezésre. Ismert, hogy a PACAP fokozza a vascularis endotheliális növekedési faktor (VEGF) termelést (Gloddek et al., 1999; Moody et al., 2002). Azonban a PACAP direkt endothelsejteken kifejtett hatása nem volt ismert. Elsőként írtuk le, hogy a PACAP az oxidatív stresszel szemben védi az endothelsejteket, melynek a PACAP egyéb, neuronális és nem-neuronális védő hatásában is szerepe lehet, hiszen az endothel károsodása számos vascularis degenerációs folyamat része.

A PACAP jelenlétét és számos hatását vizsgálták korábban az urogenitális traktusban, mint pl. fokozza a vizeelési reflex aktivitást és csökkenti a cystitis kapcsán fellépő gyulladásos folyamatokat (Braas et al., 2006; Fahrenkrug és Hannibal, 1998;

Girard et al., 2008). Azonban a vese és a PACAP kapcsolatáról igen keveset tudunk. Kimutatták, hogy a PACAP receptorai előfordulnak a vesében (Reubi, 2000; Sreedharan et al., 1995). A PACAP fokozza a renin szekréciót a vesében (Hautmann et al., 2007) és növeli a renális véráramlást (Nilsson, 1994). A PACAP vesében kifejtett védő szerepe már korábban is ismert volt, miszerint a PACAP infúzió, gyulladásgátló hatásán keresztül ischaemiás vesekárosodásban védelmet nyújtott (Riera et al., 2001). Mások diabeteses nephropathiában, myelomás és gentamicin-indukálta vesekárosodásban mutatták ki a PACAP védő szerepét, a citokin szupresszió és az apoptotikus útvonalak gátlásán keresztül (Arimura, 2006; Li et al., 2008). Legújabb irodalmi adatok alapján humán kipróbálásban is érvényesült ez a myelomás vesekárosodás elleni védelem (Li et al., 2007). Ezen megfigyeléseket bővítik eredményeink, miszerint egyszeri bolusban alkalmazott PACAP kezelés is képes *in vivo* csökkenteni a mortalitást és a tubuláris károsodást. Jelenleg ennek molekuláris mechanizmusát vizsgáljuk, és kimutattuk, hogy az ischaemia/reperfúzió során jelentős mértékben lecsökkent Bcl-2 expressziót a PACAP szignifikánsan növeli (közlés alatt).

Végül kimutattuk, hogy a PACAP nemcsak gerinces sejtekben, hanem gerinctelen szervezetben is antiapoptotikus hatással rendelkezik. A PACAP-ot az egyik legkonzerváltabb szerkezetű neuropeptidként tartják számon (Arimura, 1998; Vaudry et al., 2000a), azonban gerinctelenekben való előfordulásáról és hatásairól keveset tudunk. Mi több gerinctelen fajban is tanulmányoztuk a PACAP és a PAC1 receptor előfordulását, így több gyűrűsféreg fajban és egy puhatestű fajban leírtuk a PACAP és a PAC1 idegrendszeri és perifériás eloszlását (Hernádi et al., 2008; Molnár et al., 2006, 2008; Pirger et al., 2008; Reglődi et al., 2000; Somogyi et al., 2009; Somogyvári-Vigh et al., 2000). Az értekezés részét képező közleményben elsőként mutattuk ki, hogy a PACAP rendelkezik antiapoptotikus hatással dopaminnal és colchicinnel kiváltott nyálmirigy apoptózisban. Azért választottuk ezt a modellt, mert kollaborációs partnereink korábban részletesen tanulmányozták a nyálmirigyben előforduló apoptózis jelenségét (Pirger et al., 2009). A gerinctelen szervezetekben kimutatott PACAP hatások hozzásegíthetnek a PACAP alapvető, filogenetikailag konzervált funkcióinak megismeréséhez, és számos további kísérletnek képezhetik az alapját.

A PACAP általános sejtvédő hatásától eltérő hatásai egyes sejtekben

Az irodalmi adatok azonban nem minden sejt esetében mutatnak sejttúlélést elősegítő hatást. Egyes esetekben a PACAP ellentétes hatást fejt ki, mégpedig gátolja a sejtek túlélését, mint pl. myeloma és humán leukémia sejtekben (Hayez et al., 2004; Li et al., 2006). Továbbá kimutatták, hogy a PACAP KO egerekben gyakrabban fejlődik ki colorectalis tumor (Nemetz et al., 2008). Kardiális fibrocitákban a PACAP gátolja a proliferációt és a fehérjeszintézist (Sano et al., 2002). Más esetekben pedig azt találták, hogy a PACAP, ellentétben a VIP-pel, nem befolyásolja a sejtek túlélését, mint pl. myentericus neuronkultúrában (Sandgren et al., 2003). Pancreas tumorsejtekben leírták, hogy a PACAP sem a cAMP szintet, sem a sejtproliferációt nem befolyásolja (Rékási et al., 2001). Ezen eltérő hatások hátterében az állhat, hogy a PACAP receptorok közül melyik splice variáns expresszálódik az adott sejtekben. További tényező lehet az az ismert tény, hogy különböző sejttypusokban egy ligand pleiotrop biológiai választ idézhet elő a szövet/sejtspecifikus szignáltranszdukciós útvonalak miatt (Szeberényi, 1999). Különösen tumorsejtekben fordulhat elő, hogy a PACAP-nak egy másik receptortípusa jelenik meg, mely eltérő hatást közvetít, vagy a tumorsejtekben eltérő jelátviteli utak aktiválódnak. Ezt kimutatták a fejlődő idegrendszerben is: a fejlődés során egy adott időpontban a PACAP receptormintázata megváltozik, így hatása a proliferációt serkentő hatásról átváltozik gátló hatássá (Meyer, 2006; Nicot és DiCicco-Bloom, 2001). A PACAP kezelés ideje is befolyásolhatja a sejttúlélésre kifejtett hatását, mint ahogy azt prostata tumorsejtekben kimutatták: rövid idejű PACAP kezelés a sejtek proliferációját fokozta, míg hosszan tartó kezelés ellenkezőleg, a sejtek proliferációját gátolta, és neuroendokrin differenciációját serkentette (Farini et al., 2003). Saját eredményeink is alátámasztják azon megfigyeléseket, miszerint a PACAP-nak általános citoprotektív hatásai mellett lehetnek épp ellenkező, sejttúlélést gátló hatásai. Ezt mi choriocarcinoma sejtekben tapasztaltuk, ahol a PACAP potenciórozta az oxidatív stressz és az *in vitro* hypoxia sejtpusztító hatását (Boronkai et al., 2009). Annak igazolása, hogy ezen hatás a trophoblast sejtekre jellemző, vagy a daganatra, további vizsgálatokat igényel. Azonban mindenképpen érdekes további kérdéseket vet fel, hogy a PACAP hogyan hat daganatsejtekre: egyes sejtek proliferációját fokozza, másokét gátolja, megint másokét pedig nem befolyásolja (ld. fent). Ennek a későbbiek során klinikai következményei is

lehetnek. Fontos legújabb irodalmi adat, hogy a PACAP a ciszplatin (chemoterápiás szer) neurotoxikus mellékhatásait képes gátolni, azonban a primér target, az ovariumtumor sejtekben nem befolyásolja sem a proliferációt, sem a ciszplatin-okozta sejtpusztulást, tehát a daganatellenes szer hatását nem csökkenti (Aubert et al., 2008). Végül említésre méltó, hogy legújabb vizsgálataink szerint a PACAP ellentétes hatásokat tud kifejteni a napi ritmustól és koncentrációtól függően is, amit pinealociták 14-3-3 fehérje és p38 MAPK jelátviteli utakon vizsgáltunk. Azt találtuk, hogy egyes napszakokban a p38 MAPK foszforilációját gátolta, más időpontokban pedig serkentette, és hasonló megfigyeléseket tettünk 14-3-3 fehérje esetén is (Rácz et al., 2008). Míg sok esetben a PACAP koncentrációtól függően ugyanazt a hatást mutatja, csak eltérő mértékben, addig pinealocitákon 1nM koncentrációban a PACAP nem változtatta meg a p38 foszforiláció napi ritmusát, közepes koncentrációban (10nM) egy fázissal eltolta azt, míg még magasabb koncentrációban (100 nM) teljesen megszüntette ezt a napi ritmust. Annak eldöntése, hogy ez az ellentétes hatás más sejtekre is jellemző, vagy a pineale sejtek, mint a napi ritmus szabályozásában fontos sejtek sajátossága, további vizsgálatokat igényel.

A PACAP NEUROTROPHICUS HATÁSAI

A PACAP *in vitro* neurotrophicus hatásai

A PACAP neuroprotektív hatásával szorosan összefügg az idegrendszer fejlődésében betöltött szerepe, mely további adatokat szolgáltat a neuroprotektív hatás megértéséhez. Ezzel kapcsolatban is számos összefoglaló közlemény született (Meyer, 2006; Waschek, 2002; Watanabe et al., 2007; Zhou et al., 2001). Azért nagyon fontos a PACAP fejlődésben betöltött szerepét ismerni, mert az idegrendszert ért károsító behatásokra az embrionális fejlődésben szerepet játszó mechanizmusok újra fokozottabban aktiválódnak (Waschek, 2002). A PACAP endogén szerepét tovább erősítik a PACAP KO egereken végzett megfigyelések. PACAP KO egerekből származó kisagyi szemcsesejtek érzékenyebben reagálnak ethanolra és oxidatív stresszre (Vaudry et al., 2005). KO egerek kisagyi fejlődése is eltér a normáltól: a differenciáció késleltetett, az apoptózis növekedett (Allais et al., 2007). Armstrong és munkatársai (2008) leírták, hogy KO egerekben a nervus ischiadicus átvágása utáni axonregeneráció késleltetett.

A PACAP és a PAC1 receptor az embrionális fejlődés igen korai szakaszában megjelenik, egérben a 9. napon, patkányban a 13. embrionális napon a neuroepitheliális sejtekben. Hasonlóan más neurotrophicus faktorokhoz, születés után a PACAP szint csökkenést mutat (Waschek, 2002; Watanabe et al., 2007). Újabb irodalmi adatok szerint a PACAP rágcsálókban leírt fejlődésben betöltött szerepe hasonló a majom és az emberi idegrendszerben is (Aubert et al., 2007; Basille et al., 2006a,b). A PACAP expresszió időbeli lefolyása az embrionális fejlődés folyamán szoros összefüggést mutat a velőcső fejlődési mintázatával, a sejtproliferáció és a migráció, valamint az apoptózis időbeli lefolyásával (Botia et al., 2007; Waschek, 2002). Igen érdekes megfigyelés, hogy azokon az agyterületeken, ahol intenzív felnőttkori neurogenesis zajlik, mint pl. patkány olfactorius epitheliuma, subventricularis zónák, hippocampus, a PACAP koncentrációja felnőttkorban is igen magas marad és fokozza az őssejtek proliferációját (Hansel et al., 2001; Mercer et al., 2004; Watanabe et al., 2007). Részben ezzel függenek össze azon kísérleteink, melyek a PACAP megjelenését és szerepét alacsonyabbrendűekben vizsgálják, ám ez nem képezi az értekezés érdemi részét. A PACAP egy filogenetikailag igen konzervált peptid, ami valószínűsíti alapvető biológiai szerepét (ld. fent). Több gerinctelen szervezetben mutattuk ki a PACAP-ot, illetve receptorát, és a PACAP egyes biológiai hatásait. Kimutattuk például, hogy gerinctelen állatokban, mint gyűrűsférgekben és puhatestűekben is megjelenik a PACAP, és a receptorok aktívak, hiszen PACAP adásra cAMP emelkedést, elektromos aktivitás változást, és antiapoptotikus hatást figyeltünk meg *Helix pomatiában* (Hernádi et al., 2008; Molnár et al., 2006, 2008; Pirger et al., 2008; Reglödi et al., 2000; Somogyi et al., 2009; Somogyvári-Vigh et al., 2000). Földigilisztában kifejezett emelkedést találtunk az embrionális fejlődés során, ami mellett párhuzamos csökkenést figyeltünk meg az embrió tápláló kokonfolyadékban (Boros et al., 2008). Ezen adatok erősítik azt a nézetet, hogy a filogenetikailag konzervált szerkezet alapvető biológiai funkciókért felelős, mint pl. a fejlődés és neuronális túlélés szabályozása.

Nem jelenthető ki egyértelműen, hogy a PACAP a neuroblastok proliferációját fokozza vagy gátolja, hiszen a fejlődés során meghatározott ütemben folyik a sejtek szaporodása, apoptózisa, differenciációja és migrációja. Azok a neuronok, melyek a fejlődés során nem építik ki a megfelelő szinaptikus kapcsolatokat, vagy nem érik el

végző helyüket, apoptózissal eliminálódnak (Sanes et al., 2006). Ennek irányításához több száz faktor együttes koordinált működése szükséges, melyek közül egy faktor a PACAP. A PACAP hatása számos tényezőtől függ, többek között a sejtípustól, a fejlődési stádiumtól, a receptor variáns expressziótól, más trophicus faktorok és szignálok jelenlététől, illetve hiányától. Ezért a leírás helyett egy táblázatban foglaltam össze a PACAP főbb ismert idegrendszeri fejlődésben betöltött szerepét, a teljesség igénye nélkül (IV.2. táblázat).

IV.2. táblázat. A PACAP fejlődéstani hatásai az idegrendszerben

Fejlesztési hatás	Sejt-szövet típus	Irodalom
Astrocita differenciáció	Kortikális prekurzorok	Vallejo és Vallejo, 2002
	Neuronális őssejtek	Ohno et al., 2005
Axonnövekedés, differenciáció	DRG neuronok	Nielsen et al., 2004
Axonnövekedési kúp stimuláció	Velőcső neuroblastok	Guirland et al., 2003
Dendrit növekedés gátlás	Sympathicus neuroblastok	Drahushuk et al., 2002
Dendritnövekedés, elágazódás stimuláció	Hippocampalis neuronok	Henle et al., 2006
Differenciációt fokozó génreguláció	PC12 sejtek	Ishido és Masuo, 2004
Dopaminerg fenotípus meghatározás	Fejlődő retina	Borba et al., 2005
Lamináris helyzet meghatározás, migráció szabályozás (CREB foszforiláció, sejtiklusból való kilépés majd differenciáció)	Fejlődő agykéreg	Ohtsuka et al., 2008
Mitózis gátlás, shh gátlás, differenciáció	Kisagyi szemcsesejtek	Nicot et al., 2002
Mitózisgátlás, differenciáció stimuláció, neurit növekedés, trkB expresszió stimulálás	Kortikális prekurzorok	Lu és DiCicco-Bloom, 1997
Neuronális migrációt szabályozza, „stop szignál” a vándorlás során, differenciáció stimuláció	Kisagyi szemcsesejtek	Cameron et al., 2007; Falluel-Morel et al., 2005
Neuritnövekedés	Kisagyi neuroblastok	Gonzalez et al., 1997
Neuritogenezis stimuláció	PC12 sejtek	Deutsch és Sun, 1992; Ravni et al., 2008; Sakai et al., 2004
Neuritogenezis, neurofilament expresszió, citoskeletális markerek stimulációja	Humán neuroblastoma sejtek	Heraud et al., 2004; Monaghan et al., 2008
Neuronális differenciáció	Embriónális őssejtek	Cazillis et al., 2004
Oligodendrocyta proliferáció, myelogenezis késleltetése	Oligodendroglia progenitorok	Lee et al., 2001; Lelievre et al., 2006
Proliferáció stimuláció	Olfactorius neuronok	Hansel et al., 2001
	Előagyi neuronális őssejtek	Ohta et al., 2006
	Csirke neuroblastok	Erhardt és Sherwood, 2004
Ventrális-dorzális patterning, shh antagonizálás	Velőcső	Waschek et al., 1998

Részletesebben kívánok írni a PACAP és más neurotrophicus faktorok kapcsolatáról, hiszen ezek szorosan együttműködve fejtik ki hatásukat a fejlődés és regeneráció során egyaránt. A neurotrophicus faktor-regulálta jelátviteli folyamatok együttese irányítja a neuronális fejlődést, nem egyetlen útvonal, hanem több, paralell útvonal együttes

aktiválásán, illetve gátlásán keresztül (Ravni et al., 2008; Szeberényi, 1999). Jó példa erre a PACAP koordinált együttműködése más trophicus faktorokkal. Többek között kimutatták, hogy a PACAP aktiválja a BDNF, trkA és a trkB neurotrophin receptor expressziót (Lee et al., 2002; Ohtsuka et al., 2008). Fordítva, az NGF, EGF és IGF-1 upregulálja a PACAP-ot és a PAC1 receptort (Hashimoto et al., 2000; Jamen et al., 2002), és újabb adatok szerint az IGF hatás egy részéért a PAC1 receptor transzaktivációja a felelős (Delcourt et al., 2007). Az agykéregben az IGF-fel és FGF-fel együttműködve szabályozza a proliferáció-differenciáció átmenetet, ezzel a sejtciklusból való kilépést és a neuronok végső lamináris helyzetének meghatározását (DiCicco-Bloom et al., 1998). FGF jelenlétében például a PACAP stimulálja a kortikális neuronok proliferációját, míg hiányában gátolja. Így az FGF befolyásolja a PACAP fejlődés során bekövetkező „switch” jelenséget, minthogy a proliferáció stimulálás után inkább a neuronok differenciációját fokozza (Lelievre et al., 2002). PC12 sejtekben a PACAP az NGF-fel és EGF-fel szinergizmusban szabályozza a neuritnövekedést (Lazarovici et al., 1998; Sakai et al., 2004). Fejlődő chromaffin sejtekben bármelyik trophicus faktor, köztük a PACAP is, elegendő a neuronális fenotípus kialakításához, amit azonban teljesen gátol a glukokortikoid-indukálta nem-neuronális fenotípus fejlődési hatás (Wolf és Kriegstein, 1995). A szerzők részben ezzel magyarázzák azt, hogy a mellékvesevelőben a sejtek többsége nem-neuronális fenotípust mutat. Érdekes további példa a hátsó gyöki ganglionok fejlődése, mely egy igen heterogén populációja a neuronoknak és gliasejteknek, ahol ezek szorosan egymás mellett fejlődnek. Míg a nagyméretű proprioceptorok és mechanoreceptor sejtek már apoptózist mutatnak az első fejlődési hullám után, addig a második fejlődési hullámban fejlődő kisebb méretű fájdalom és hőérző neuronok proliferálnak (Nielsen et al., 2004). Itt a PACAP-nak a neuronális progenitor sejtek differenciálódást elősegítő hatását írták le együttműködve más trophicus faktorokkal, pl. CNTF, TGF1-beta, GDNF, FGF, LIF (agonista és antagonist hatások egyaránt). Egy másik fontos tényező, hogy a PACAP-nak melyik receptora expresszálódik. A fejlődés során bekövetkező PACAP receptor váltást a short és hop izoformák kapcsán írták le, a short forma gátolja a kortikális prekurzorok osztódását, míg a hop forma stimulálja azt (Nicot és DiCicco-Bloom, 2001).

Ennek alapján kutatók arra gondolnak, hogy a PACAP és receptorai központi szerepet játszanak a környezeti és endogén szignálok integrálásában, melyek együttese az idegrendszer normál fejlődését, és szükség esetén regenerációját biztosítja (Nicot et al., 2002). Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint normál kortikális neuronokon a PACAP nem befolyásolja a BDNF expressziót, viszont excitotoxikus hatásnak vagy szérum megvonásnak kitett neuronokban az erőteljes BDNF csökkenést a PACAP kezelés ellensúlyozza (Frechilla et al., 2001).

A PACAP *in vivo* neurotrophicus hatásai

A PACAP *in vivo* neurotrophicus hatásairól azonban még keveset tudunk. Első ilyen kísérletekben kimutatták, hogy a PACAP *in ovo* beadása csirkeembriókba csökkenti az apoptotikus sejtek számát a gerincvelőben (Arimura et al., 1994). A PACAP cerebellum körüli subarachnoideális térbe való injektálása csökkenti a cerebelláris apoptózist (Vaudry et al., 1999). Neonatális ibotenát-indukálta fehérállomány lézióban a PACAP és VIP egyaránt mérsékli a károsodást a gyulladásos folyamatok gátlásával a VPAC1 receptorokon keresztül (Favrais et al., 2007). Más kísérletekben kimutatták, hogy egyszeri neonatális PACAP injekció késlelteti a pubertást nőstény patkányokban (Köves et al., 1998b; Szabó et al., 2002). A mi eredményeink is alátámasztják a PACAP *in vivo* fejlődésben játszott szerepét: a fejlődés korai szakaszában alkalmazott PACAP kezelés gyorsította, míg PACAP antagonistá kezeléssel enyhén lassította a neuronális fejlődést patkányban (Reglődi et al., 2003). A glutamát fejlődést késleltető hatását a PACAP kezelés részben ellensúlyozta (Kiss et al., 2006). Csirkeembriókon végzett kísérleteink ugyancsak megerősítik, hogy a PACAP-nak *in vivo* is szerepe van az idegrendszeri fejlődésben. Az *in ovo* fejlődés első, korai szakaszában alkalmazott PACAP antagonistá kezeléssel késleltette a fejlődést, és tartósan gátolta a normál szociális magatartást (Hollósy et al., 2004). A fejlődés késői szakaszában alkalmazott kezelés már semmilyen változást nem okozott, ami alátámasztja azon *in vitro* megfigyeléseket, hogy a PACAP az idegrendszer adott fejlődési szakaszaiban eltérő hatásokkal rendelkezik, és különösen aktív az intenzív neurogenesis és differenciálódás idején. Újabb kísérleteinkben kimutattuk azt is, hogy hasonló módon, a fejlődés korai szakaszában alkalmazott PACAP antagonistá kezeléssel az olfactorius memória kialakulását is gátolja (Józsa et al., 2005).

Ezen *in vivo* hatások hátterében húzódó molekuláris mechanizmusok tisztázása még további kísérleteket igényel. A szociális magatartást gátló PACAP antagonista hatást alátámasztják a PAC1 receptor KO egereken végzett kísérletek (Nicot et al., 2004). A szerzők azt figyelték meg, hogy a KO egereknek teljesen megváltozott a szociális viselkedése: a KO hím és nőstény egerek sokkal később mutattak interakciót, hamarabb csökkent a szociális érdeklődésük, a hímek az intruder tesztben sokkal kisebb agresszivitást mutattak, mint a vad egerek. Mások PACAP KO egerekben figyelték meg, hogy a KO egerek pszichomotoros aktivitása eltérő a vad egerektől, párzási frekvenciájuk is kisebb, ami részben magyarázhatja a KO egerekben megfigyelt csökkent fertilitást (Hashimoto et al., 2001; Shintani et al., 2002). Ezenkívül az anyai magatartás is zavart szenved PACAP KO egerekben (Shintani et al., 2002). Ennek hátterében természetesen nagyon összetett faktorok játszhatnak szerepet, beleértve a fent leírt, PACAP fejlődésben betöltött szerepének részbeni gátlását, összefüggésben azzal a sok hatással, melyet már PACAP, illetve PACAP receptor KO egerekben leírtak (Sherwood et al., 2007; Shintani et al., 2003).

A PACAP JELÁTVITELI UTAKRA GYAKOROLT HATÁSA – NEUROTROPHICUS/NEUROPROTEKTÍV ÉS ÁLTALÁNOS CITOPROTEKTÍV HATÁSOK

A PACAP számos, részben egymással konvergáló jelátviteli úton keresztül fejti ki protektív hatásait. A citoprotektív hatásokért csaknem minden esetben a PAC1 receptor felelős, mivel a VIP a legtöbb tanulmányban csak több nagyságrenddel nagyobb koncentrációban hatékony, amennyiben egyáltalán hatékony. Ezt mi is igazoltuk *in vivo* stroke modellben, ahol a VIP nem fejtett ki protektív hatást (Tamás et al., 2002). A PACAP neuroprotektív hatásmechanizmusával kapcsolatban több összefoglaló közlemény is rendelkezésre áll (Botia et al., 2007; Somogyvári-Vigh és Reglődi, 2004; Waschek, 2002). A főbb molekuláris hatásokat a **IV.3. táblázat**ban foglaltam össze, ahol az irodalmi hivatkozások is megtalálhatók. A PACAP a PAC1 receptorokon keresztül aktiválja az adenilát ciklázt, és a foszfolipáz C-t, melynek hatására cAMP-függő és attól független útvonalak aktiválódnak. A PKA aktiváció hatására általában a védő hatású ERK foszforiláció megemelkedik, a neuronpusztulást elősegítő JNK és p38 MAPK

foszforiláció pedig gátlódik. Ezt mi is több esetben igazoltuk, mint retinában glutamát indukálta károsodáskor, endothelsejtek oxidatív stressz-indukálta apoptózisában és szívizomsejtek ischaemia/reperfúzió-indukálta károsodásában. A PKA célútvonalában a Rap1 és Ras aktiváción keresztül is aktiválja az ERK-t, valamint a CREB foszforilációt. Az apoptózis mitochondriális útvonalát is befolyásolja: a Bcl család antiapoptotikus tagjait aktiválja (Bcl-2, Bcl-xL), míg proapoptotikus tagjait inaktiválja (Bad, Bax). Ezzel kapcsolatban teljesen új megfigyelést is tettünk: elsőként írtuk le a PACAP hatását a 14-3-3 fehérjére, melynek aktiválásával a Bad foszforilációja, és ezzel inaktiválása növekszik, így a Bad nem tudja megkötni és ezzel gátolni az antiapoptotikus Bcl-2 és Bcl-xL fehérjéket. A citokróm *c* fehérje mitokondrium belső membránjából való felszabadulása a citoszolban aktiválja az apoptózis proteázokat. A Bcl család protektív fehérjeinek aktiválása útján csökken a mitokondriumból kiszabaduló citokróm *c* szint a citoplazmában, ami további apoptózist gátló hatással rendelkezik. A citokróm *c* csökkenést mi is kimutattuk retinában. A PACAP nemcsak a cAMP útvonalon keresztül, hanem a foszfolipáz C, inozitol trifoszfát és diacilglicerín útvonalon keresztül is hat, melyek következtében hasonló célmolekulák aktiválódnak/gátlódnak, és végül a több útvonal egymással konvergálva a kaszpáz aktivitást csökkenti. A legfőbb apoptózis effektor kaszpáz a kaszpáz-3, melynek gátlását nagyon sok tanulmányban igazolták, többek között mi is kimutattuk szívizomsejtekben és retinában. De más kaszpázok hatását is gátolja a PACAP, ezt főleg kisagyi szemcsesejteken tanulmányozták. További útvonal lehet a K⁺-csatornák gátlása, mely a PKA, Ras, Raf, ERK útvonalon keresztül ugyancsak csökkenti a sejtpusztulást. A PACAP befolyásolja a citokin jelátviteli utakat is, elsősorban a microglia sejtek citokin termelésre és célmolekuláikra kifejtett hatásán keresztül. Kimutatták, hogy a PACAP csökkenti az aktivált microgliasejtekben a p38 MAPK aktivációt (Lee és Suk, 2004; Suk et al., 2004), valamint gátolja a TNF-alfa, IL-1beta és NO felszabadulást (Delgado et al., 2003). A PACAP a kaszpáz független apoptotikus útvonalakat is gátolja, mint az AIF-t, amely a citokróm *c*-hez hasonlóan a mitokondriumból kikerülve a cytosolba apoptotikus folyamatokat indukál. A PACAP az AIF kiáramlását csökkentette glutamát-indukálta retina lézióban (Rácz et al., 2006).

Mindezen hatások együttesen lehetnek felelősek azért, hogy a PACAP számos, a sejttúlélésben szerepet játszó gén és transzkript expresszióját is befolyásolja. Kimutatták,

hogy a PACAP csökkenti az apoptózist indukáló *Amida* gén expresszióját, növeli olyan gének expresszióját, melyek a fehérje degradációját gátolják vagy csökkentik a sejtek oxidatív stressz szintjét (Chen et al., 2006; Grumolato et al., 2003). PC12 sejtekben szérum megvonás és PACAP hatására olyan fehérjék növekedett expresszióját írták le, melyek további szerepet játszhatnak a sejttúlélés stimulálásában, míg a sejtpusztulást elősegítő fehérjék szintje csökken (Lebon et al., 2006; Vaudry et al., 2002a). Ugyancsak PC12 sejtekben a PACAP számos olyan gén upregulációját indukálja, melyek a neuritogenezist stimulálják, a sejtnövekedést és differenciációt fokozzák, illetve a sejtmorfológiáért felelősek (Ishido és Masuo, 2004). Primér sympatheticus neuronkultúrában microarray vizsgálattal 147 PACAP-modulálta transzkriptet azonosítottak, többek között növekedési faktorokat, sejtciklust szabályozó faktorokat és számos sejtmetabolizmusban résztvevő faktort (Braas et al., 2007).

IV.3. táblázat. PACAP hatásai a jelátviteli molekulákra (saját eredmények kiemelve)

Jelátviteli út	Sejt-és szövettípus	Irodalom
14-3-3 fehérje ↑	Cardiomyocyt	<i>Rácz et al., 2008</i>
	Retina	<i>Rácz et al., 2007</i>
Aconitáz ↑	Kisagyi szemcsesek	<i>Tabuchi et al., 2003</i>
ADNP ↑	Kortikális neuron/glia kultúra	<i>Li et al., 2005</i>
AIF ↓	Retina	<i>Rácz et al., 2006</i>
Akt ↑	Kisagyi szemcsesek	<i>Bhave és Hoffman, 2004</i>
	Cardiomyocyt	<i>Rácz et al., 2008</i>
	Retina	<i>Rácz et al., 2007</i>
ASK-1 ↓	Cardiomyocyt	<i>Gasz et al., 2006b</i>
p-Bad ↑	Cardiomyocyt	<i>Gasz et al., 2006</i>
	Retina	<i>Rácz et al., 2006</i>
Bax ↓	Neuronális prekursor sejt	<i>Zhokhov et al., 2008</i>
Bcl-2 ↑	Pancreas beta sejt	<i>Onoue et al., 2008</i>
	Kisagyi szemcsesek	<i>Aubert et al., 2006; Falluel-Morel et al., 2004</i>
	Cardiomyocyt	<i>Gasz et al., 2006</i>
	Pancreas beta sejt	<i>Onoue et al., 2008</i>
Bcl-xL ↑	Retina	<i>Rácz et al., 2007</i>
	Cardiomyocyt	<i>Rácz et al., 2008</i>
Ca csatornák	PC12 sejt	<i>Tanaka et al., 1997</i>
c-fos ↑	Kisagyi szemcsesek	<i>Aubert et al., 2006; Vaudry et al., 1998</i>
p-CREB ↑	Kisagyi szemcsesek	<i>Bhave és Hoffman, 2004</i>
	Retina	<i>Rácz et al., 2006</i>
	Neuroblastoma F11 sejt	<i>McIlvain et al., 2006</i>
citokró m c transzlokáció ↓	Kisagyi szemcsesek	<i>Falluel-Morel et al., 2004</i>
	Retina	<i>Rácz et al., 2006</i>
ERK ↑	Kisagyi szemcsesek	<i>Falluel-Morel et al., 2004; 2007 Villalba et al., 1997</i>
	Kortikális neuron/glia kultúra	<i>Li et al., 2005</i>
	Endothelsejt	<i>Rácz et al., 2007</i>
	Hypophysis follicularis sejt	<i>Vlotides et al., 2004</i>
	Astrocita	<i>Hashimoto et al., 2003</i>
	Hippocampus	<i>Dohi et al., 2002</i>
IL-10 ↓	microglia	<i>Delgado et al., 2003</i>
JNK ↓	PC12 sejt	<i>Hartfield et al., 1998</i>
	Endothelsejt	<i>Rácz et al., 2007</i>
	Retina	<i>Rácz et al., 2006</i>
	Hippocampus	<i>Dohi et al., 2002; Shioda et al., 1998</i>
Kaspáz-3 ↓	Kisagyi szemcsesek	<i>Falluel-Morel et al., 2004; Vaudry et al., 2000b, 2002b</i>
	PC12 sejt	<i>Wang et al., 2005</i>
	Helix pomatia nyálmirigy	<i>Pirger et al., 2008</i>
	Cardiomyocyt	<i>Gasz et al., 2006</i>
	Retina	<i>Rácz et al., 2006</i>
Kaspáz 2, 6, 8 ↓	Kisagyi szemcsesek	<i>Vaudry et al., 2002b</i>
Kaspáz 9 ↓	Kisagyi szemcsesek	<i>Aubert et al., 2008; Vaudry et al., 2002b,c</i>
K csatornák gátlása	Kisagyi szemcsesek	<i>Mei et al., 2004</i>
	Olfactorius neuronok	<i>Han és Lucero, 2005</i>
Noxa ↓	Pancreas beta sejt	<i>Onoue et al., 2008</i>
p38 MAPK ↓	Microglia sejt	<i>Lee és Suk, 2000; Suk et al., 2004</i>
	Endothelsejt	<i>Rácz et al., 2007</i>
	Hippocampus	<i>Dohi et al., 2002</i>
Peroxiredoxin 2 ↑	Kisagyi szemcsesek	<i>Botia et al., 2008</i>
Ras, Rap1 ↑	Kisagyi szemcsesek	<i>Botia et al., 2007</i>
TNF alfa ↓	Microglia	<i>Kim et al., 2000, Delgado et al., 2003</i>
	Gerincevelő	<i>Kim et al., 2000</i>

PACAP upreguláció sérülések után

Az, hogy az endogén PACAP-mediálta fejlődési folyamatok idegrendszeri sérülésre újra aktiválódnak, már említésre került (Waschek, 2002). Ez több neurotrophicus faktorra is jellemző (Leker et al., 2002), és a PACAP-pal kapcsolatban is számos közlemény leírja. Többek között nervus ischiadicus átvágásnál és perifériás gyulladásnál a hátsó gyöki ganglionokban mutattak ki napokon át tartó emelkedett PACAP expressziót (Zhang et al., 1996, 1998). Hasonló upregulációt írtak le nervus massetericus átvágásnál a nucleus mesencephalicus nervi trigeminiben, nervus facialis átvágása után a nucleus motorius nervi facialisban és postganglionaris axotómia után a ganglion cervicale superiusban (Armstrong et al., 2003; Larsen et al., 1997; Moller et al., 1997; Zhou et al., 1999). Mi ezt a jelenséget alacsonyabbrendűekben is vizsgáltuk: trágyagiliszta kaudális testvég átvágásakor a regeneráció során erőteljes PACAP expresszió növekedést találtunk (Várhalmi et al., 2008). Emlős globális agyi ischaemiában a kezdeti PACAP csökkenés után napok múlva ugyancsak emelkedést figyeltek meg a hippocampus ischiemiára legérzékenyebb CA1 régiójában, míg a legkevésbé érzékeny CA3 régióban nem találtak hasonló változást (Shin et al., 2001). Agyi traumában erőteljes PACAP upregulációt mutattak ki a cortex és a gyrus dentatus területén (Skoglosa et al., 1999), míg fokális agyi ischaemiában leírták a PAC1 receptor upregulációját (Ciani et al., 1999). A fejlődés során szerepet játszó PACAP hatásokat az utóbbi időben idegrendszeri lézióban is igazolták: axotómia esetén a PACAP, hasonlóan a fejlődésben tapasztaltakkal, fokozza az axonnövekedést, és az idegi regenerációt (Suarez et al., 2006), míg PACAP KO egerekben az axotómia utáni regeneráció lassult (Armstrong et al., 2008). Mindezekből úgy tűnik, hogy az idegrendszerben több PACAP-regulálta mechanizmus mintegy újra aktiválódik akkor, ha valami károsító behatás történik. Nagyon sok esetben az ép sejtek túlélését nem befolyásolja a PACAP, viszont károsító ingerre a sejttúlélést fokozza. Ezt mi minden, általunk alkalmazott *in vitro* kísérletben megfigyeltük: a PACAP és PACAP antagonisták a normál sejtek túlélését önmagában nem befolyásolta, míg károsító hatásra a PACAP jelentős védelmet nyújtott. Kivételt képeznek a trophoblast sejtekben megfigyelt eredmények (ld. fent). Ugyancsak megerősítik a PACAP endogén szerepét azon megfigyeléseink, miszerint a PACAP önmagában számos sejttúlélést elősegítő mechanizmust indukál a retinában *in vivo*, míg a PACAP antagonisták pedig a sejthalált

előidéző folyamatokat aktiválja, mint pl. kaszpáz-3 (III.5. fejezet). Hasonlóan, a PACAP antagonistá önmagában is súlyosbította a retinadegenerációt MSG-indukálta lézióban (III.3. fejezet).

Antiinflammatorikus hatások

Egy másik, a PACAP neuroprotektív hatásaiban fontos szerepet játszó faktor az antiinflammatorikus hatás. Bár a PACAP immunrendszerben kifejtett hatása igen összetett (Ganea és Delgado, 2002), és nem minden immunsejtben és gyulladásos folyamatban egyértelmű a PACAP antiinflammatorikus hatása, jelen fejezetben az idegrendszeri hatásokra összpontosítanék. Az idegrendszeri léziók során a gliasejtek gyorsan aktiválódnak, és stimulálják más gyulladásos sejtek migrációját, sejtadhéziós molekulák, citokinek és kemokinek fokozott elválasztását, melyek hatása rendkívül összetett (Falus, 1998; Stoll et al., 2002). Így az ischaemia, a neurodegeneráció és a trauma közvetlen következményeit is súlyosbítják a másodlagos gyulladásos folyamatok. A microglia aktiváció végső kimenetele sok más anti- és proinflammatorikus faktortól függ, mégis, a microglia aktiváció experimentális gátlása a legtöbb esetben a központi idegrendszeri károsodást csökkenti. A microglia sejtek számos gyulladásos faktort termelnek, pl. TNF-alfa, IL-1beta, IL-12, NO és több kemokint, melyeket a PACAP és VIP egyaránt csökkent (Ábrahám et al., 2003; Delgado et al., 2002, 2003; Lee és Suk, 2004). Azt is igazolták, hogy a PACAP gátolja a hypoxia-indukálta microglia aktivációt (Suk et al., 2004). Ezen hatások többnyire nem a PAC1, hanem a VIP-pel közös, VPAC receptorokon keresztül valósulnak meg. Újabb megfigyelések arra utalnak, hogy az *in vitro* megfigyelt hatások *in vivo* körülmények között is érvényesülnek (Abad et al., 2006). Ezt mi is igazoltuk több, perifériás gyulladásos folyamatban: a PACAP felszabadul a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekből és ez gátolja a gyulladáskeltő szenzoros neuropeptidek (mint a substance P és a calcitonin gene-related peptide) felszabadulását (Németh et al., 2006). Továbbá igazoltuk, hogy a szisztémás PACAP kezelés az akut neurogén (kapszaicin vagy resiniferatoxin-nal kiváltott), és vegyes gyulladást (karrageninnel kiváltott) gátolni képes a periférián (Helyes et al., 2007). Legújabb vizsgálataink szerint perifériás gyulladásos modellekben a PACAP antinociceptív, antihyperalgéziás és antiallodíniás hatással is rendelkezik (Sándor et al., 2008). Ezen

tanulmányok részletes tárgyalása nem tartozik az értekezéshez, csupán további megerősítést adnak arra, hogy a PACAP rendelkezik gyulladásgátló hatásokkal, és a neurális eredetű gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokat is befolyásolja.

A PACAP egyéb, a neuroprotektív hatásokban esetlegesen szerepet játszó hatásai

Több eddigi adat is arra utal, hogy a PACAP a neuroprotektív hatásait részben nem direkt a neuronokon, hanem az astrocitákon keresztül fejti ki. Az astrociták expresszálják a PACAP receptorokat, és vannak olyan irodalmi adatok, melyek a PACAP fő célsejtjének az astrocitát tekintik (Hashimoto et al., 1996; Tatsuno et al., 1990, 1996). A PACAP az astrociták fejlődésében is szerepet játszik (**IV.2. táblázat**), és számos faktor elválasztását stimulálja, melyek egyensúlya dönti el, hogy az inflammatorikus vagy a trophicus hatások érvényesülnek-e (Brenneman et al., 2002, 2003). Például a PACAP stimulálja az IL-6-ot, mely egy inflammatorikus citokin, de agyi ischaemiában védő szerepe van (Tatsuno et al., 1991). Részben ezzel magyarázzák a PACAP hatását is cerebrális ischaemiában, hiszen IL-6 KO egerekben a PACAP neuroprotektív hatása blokkolódott (Ohtaki et al., 2006). A PACAP stimulálja egyes neurotrophicus faktorok felszabadulását is az astrocitákból, mint pl. activity-dependent neurotrophic factor (ADNF) és activity-dependent neurotrophic protein (ADNP) (Masmoudi-Kouki et al., 2007). Legújabb irodalmi adatok is alátámasztják a PACAP és az astrociták sokrétű kölcsönhatását a neuronális védelemben (Masmoudi-Kouki et al., 2007; Shieh et al., 2008). Továbbá, a PACAP stimulálja az astrociták általi glutamát felvételt és lebomlást, melynek szerepe lehet az excitotoxicitás elleni védelemben (Figiel és Engele, 2000). Azonban a reaktív gliosis, mely az astrociták krónikus aktiválása útján jön létre, további károsodást eredményezhet. A PACAP-ról kimutatták, hogy ezt a reaktív gliosist csökkenti, az astrociták citoskeletális reorganizációja által (Perez et al., 2005).

A PACAP-nak számos egyéb tulajdonságát kimutatták, melyek együttesen hozzájárulhatnak a neuroprotektív hatásokhoz. Ilyen a PACAP vazodilatátor hatása, melyet agyi ereken is vizsgáltak, és saját vizsgálataink is megerősítik ezt. Kimutattuk, hogy a PACAP átmenetileg fokozza a kortikális keringést, melynek szerepe lehet a PACAP protektív hatásában agyi ischaemiában (Reglődi et al., 2002). Ezt más kutatócsoportok is vizsgálták, többek között újszülött malacban a PACAP erőteljes

arterioláris vazodilatációt okoz (Lenti et al., 2007), valamint az arteria vertebralis és más cerebrális erek vazodilatációját és ezzel a cerebrális véráramlás fokozódását is kimutatták (Jansen-Olesen et al., 1994; Seki et al., 1995; Uddmann et al., 1993). *In vitro* is erőteljes vazorelaxáns hatása van a PACAP-nak agyi erekre (Anzai et al., 1995; Dalsgaard et al., 2003). Érdekes módon, a humán vizsgálatok ellentmondásos eredményeket mutatnak: egyrészt kimutatták, hogy a PACAP *postmortem* lenticulostriális és arteria cerebri posterior erekben vazodilatátor hatású (Jansen-Olesen et al., 2004), másrészt egészséges önkéntesekben enyhén csökkentette a cerebrális véráramlást (Birk et al., 2007). Magas dózisé PACAP kezelés hasonló enyhe csökkenést okozott egér agyi keringésére (Ohtaki et al., 2004). Ezen ellentmondások háttérében álló mechanizmusok további vizsgálatokat igényelnek.

További protektív faktor lehet a PACAP hatása a trombocita aggregációra. Bár ezt mi is vizsgáltuk, és nem találtunk trombocita aggregációra kifejtett hatást (Reglődi et al., 2004), azonban más kutatócsoportok leírtak trombocita aggregáció gátló hatását a PACAP-nak (Freson et al., 2004; Kis et al., 1999). Ugyancsak egy faktor lehet a PACAP antioxidáns hatása, amit mi csak nagyobb dózisé PACAP kezeléssel tudtunk igazolni (Reglődi et al., 2004), de több adat is van arra, hogy a PACAP direkt, illetve indirekt módon antioxidáns hatású az antioxidáns enzimek aktiválásán keresztül (Botia et al., 2008; Reglődi et al., 2004; Tabuchi et al., 2003). Legújabb vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a PACAP jelentősen csökkenti a vékonybél ischaemia során fellépő oxidatív stressz markereket, mint a malondialdehid, és növeli az antioxidáns rendszer aktivitását (szuperoxid dizmutáz és glutation) (Ferencz et al., 2009).

A 6-OHDA-nal kiváltott substantia nigra degenerációban a PACAP-pal kezelt állatok akutan sem mutattak hypokinetikus tüneteket. Az aszimmetrikus jelek akutan jelentkeztek, viszont a PACAP-pal kezelt állatokban 10 nappal a lézió után megszűntek. Az akutan sem jelentkező hypokinesia háttérében az is állhat, hogy a PACAP fokozza az állatok aktivitását: icv PACAP adása egerekben és patkányokban is fokozott lokomotoros aktivitáshoz és ágaskodáshoz vezet (Masuo et al., 1995; Morley et al., 1992). Ezt a Huntington-chorea modellben kapott eredményeink is alátámasztják, ahol az akutan jelentkező mozgászavar nem hypo-, hanem hyperkinesia. Ebben a kísérletben a nagyobb dózisé PACAP kezelés a kontroll állatokhoz hasonlóan akut hyperkinesiát

eredményezett, míg alacsonyabb dózisú PACAP kezelésnél nem jelentkezett ez az akut hatás. Ugyancsak hozzájárulhat a PACAP Parkinson-kór modellben tapasztalt nagyfokú tünetjavító hatásához az, hogy a PACAP fokozza a TH-tartalmú agytörzsi neuronális aktivitást, a TH aktivitást, és ezzel a dopamin szintézist (Farnham et al., 2008; Isobe et al., 2003; Moser et al., 1999; Rius et al., 1994).

A PACAP HATÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA

Korábbi munkáinkban kimutattuk, hogy a spontán fellépő hyperthermia elkerülhetetlen következménye a kísérletes MCA okklúciónak, melyet később mások is megerősítettek (Ábrahám et al., 2002; Reglődi et al., 2000b). A spontán hyperthermia meggyorsítja a penumbrális terület bevonódását az infarctusos területbe (Reglődi et al., 2000b). A hyperthermia hatására bekövetkezett penumbrális terület csökkenése különösen fontos therápiás szempontból, hiszen az első órákban a penumbrális terület csökkentése az általános therápiás célpont. A hyperthermia hatására csökkent penumbrális terület csökkentheti a neuroprotektív anyagok hatékonyságát (Memezawa et al., 1995). Korábban igazoltuk, hogy az enyhe hyperthermia, mely stroke betegekben gyakran előfordul, nem befolyásolja a PACAP fokális ischaemiában kifejtett védő hatását (Reglődi et al., 2000c). Jelen értekezésben több más, a PACAP hatását befolyásoló tényező került bemutatásra. Az *in vivo* modellekkel kapcsolatban számos általános megfigyelést tettünk, mely ugyancsak befolyásolhatja neuroprotektív szerek effektivitását.

A funkcionális deficit értékelési szempontjai és a neuroprotektív hatás összefüggése

A neuroprotektív hatás tesztelésénél fontos annak vizsgálata, hogy a morfológiai károsodás csökkenése mennyiben tükröződik a funkcionális javulásban, és ehhez a lehető legrészletesebb neurológiai vizsgálat szükséges (Corbett és Nurse, 1998). Stroke modellben ezért összeállítottunk egy 16 pontból álló tesztskálát, mely az irodalomban legismertebb egyszerű tesztek tartalmazta. Azonban megfigyeléseink szerint ez a tesztskála nem mutat korrelációt az infarktus nagyságával, mely arra utal, hogy az infarktus magjának károsodását méri (Reglődi et al., 2003). Ezt igazolta a PACAP

funkcionális hatásának vizsgálata fokális ischaemiában. A tesztskála alapján mért poszturális reakciók, egyensúlyzavarok, ráhelyezési reflexek, spontán lokomotoros aktivitás és izomerő, nem mutattak különbséget a PACAP-pal kezelt és a kontroll állatok között (Reglődi et al., 2002). Azonban finomabb orientációs tesztekkel a PACAP funkcionális javító hatása igazolható volt. Leginkább a hátsó testfél érintésére adott válaszreakcióban volt ez a javító hatás megfigyelhető, melynek az lehet a magyarázata, hogy a hátsó testfél kérgi reprezentációja már a penumbrális területre esik, melynek károsodását a PACAP kezelés csökkentette (Memezawa et al., 1992). Az infarktus magjában fellépő károsodás általában nem csökkenthető neuroprotektív szerekkel, és ezt a PACAP esetében is igazoltuk. Ezen vizsgálatok arra is utalnak, hogy a megfelelő funkcionális tesztelés mennyire fontos a neuroprotektív szerek effektivitásának értékelésekor. Az, hogy egy anyag az általánosan alkalmazott tesztelés során nem mutat javító hatást az infarktus nagyságának csökkentése ellenére, nem feltétlenül jelenti, hogy funkcionális javulás nem kíséri a neuroprotektív hatást. Lehetséges, hogy a rosszul kiválasztott tesztelés az oka a negatív eredménynek, mint ahogy azt mások is felvetették (Campbell et al., 1997; Yamaguchi et al., 1995).

A 6-OHDA lézió és a PACAP hatásának nem- és korfüggése Parkinson-kór modellben

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy habár a dopaminerg sejtek pusztulásának mértéke csak kissé volt súlyosabb idős állatokban, az akut tünetek egy része, illetve a javulás a fiatal állatokban lényegesen jobb volt. Ezt mások megfigyelései alátámasztják, miszerint idős állatokban az aktivitási szint jóval alacsonyabb, és a pars compacta neuronjai az öregedéssel párhuzamosan degenerálnak (Hebert és Gerhardt, 1998). Számos tanulmány vizsgálta a dopaminerg rendszer korral járó változásait, melyek részben magyarázzák a megfigyelt motoros aktivitási különbségeket. Többek között leírták, hogy a korral csökken a dopamin felszabadulás (Dobrev et al., 1995; Emborg et al., 1998; Kametani et al., 1995), a dopamin metabolizmusa (Marschall és Rosenstein, 1990) és a D1 és D2 receptor aktiváció (Gould et al., 1996). Ezzel függ részben össze, hogy idős állatok érzékenyebben reagálnak neurotoxikus kezelésekre. Ezt több Parkinson-kór modellben is kimutatták. Idős egerekben MPTP adása jóval nagyobb mértékű sejtpusztulást

eredményez, mint fiatal állatokban (Ali et al., 1993). A 6-OHDA hatása azonban nem ennyire egyértelműen idős állatokban. Leírták, hogy idős állatokban jobban csökken a dopamin szint a toxikus kezelés hatására, és a kompenzatorikus mechanizmusok sem annyira effektívek, mint fiatalokban (Marschall et al., 1983; Yurek et al., 2001). A mi eredményeink azt mutatják, hogy habár a dopaminerg sejtek pusztulásának mértéke nem különbözött jelentősen az idős állatoknál, a magatartási jelek jóval súlyosabbak voltak, amit más megfigyelések is alátámasztanak (Lindner et al., 1999).

A nemi különbségek jóval kifejezettebbek voltak, mint a korkülönbségek a 6-OHDA lézióban. A nőstény állatoknál a magatartási tünetek sokkal enyhébbek voltak, amit a dopaminerg sejtek pusztulásának kisebb mértéke is alátámasztott. Ez összhangban van mások megfigyeléseivel (Murray et al., 2003). Különböző idegrendszeri léziókra a nőstény állatok kevésbé érzékenyek, mint pl. ischaemia és neurotrauma (Alkayed et al., 1998; Stein, 2001; Suzuki et al., 2003). A női gonadális hormonok az idegrendszeri sérülés akut hatását csökkenthetik és gyorsítják a regenerációs folyamatokat (Azcoitia et al., 2002; Merchenthaler et al., 2000). A nőstényekben a nigrostriatális pálya működésében több nemi különbséget is leírtak, és az ösztrogén moduláló hatása is ismert (Dluzen és Horstink, 2003). Ez magyarázhatja azt, hogy nőstények nem annyira érzékenyek a nigrális neurotoxinokkal szemben (Dluzen, 1997; Murray et al., 2003), ami az általunk alkalmazott Parkinson-kór modellben megfigyelt endogén neuroprotektációt alátámasztja. Ennek fényében nem meglepő, hogy az ovariectomizált állatok érzékenyebben reagálnak a kezelésre, míg a kasztrált hímeknél a 6-OHDA kezelésnek kisebb toxikus hatása volt. Ezt más idegrendszeri károsodásnál is megfigyelték, mint pl. neurotraumában (Bramlett és Dietrich, 2001).

Annak tükrében, hogy a 6-OHDA neurotoxikus hatására súlyosabb léziót mutatnak idős állatok, mint a fiatalok, illetve hímek, mint a nőstények, nem meglepő, hogy a PACAP neuroprotektív hatásai is eltérőek voltak. Idős hímekben kevésbé tudta a PACAP a dopaminerg sejtek pusztulását kivédeni, és kisebb hatása volt a magatartási jelekre is, mint fiatal hímekben. Nőstényekben ezzel szemben csak enyhe magatartási javulást tapasztaltunk, a sejtpusztulásban pedig nem okozott változást a PACAP kezelés. A kasztrált hímekben ugyan a kezelés nem volt hatással a dopaminerg sejtek számára,

azonban enyhe magatartási javulás mutatkozott, míg ovariectomizált nőstényekben kifejezetten mérsékelte a sejtszámcsökkenést.

Az idős állatokban az endogén neuroprotektív mechanizmusok folyamatos csökkenést mutatnak, így a neuroprotektív stratégiák sem vezetnek mindig olyan javuláshoz, mint fiatal szervezetekben. Többek között csökken az antioxidáns kapacitás, az endogén scavengerek mennyisége, és ezért a szabad gyök okozta károsodásra érzékenyebben reagál az idős agy, mint a fiatal (Itoh et al., 1996; Mo et al., 1995; Reiter et al., 1998). A microglia aktiváció fokozottabban jelentkezik sérülés hatására idős substantia nigrában, valamint nigrostriális deafferentáció után az astrocita reakció is fokozottabb (Gordon et al., 1997; Sugama et al., 2003). A neurotrophicus faktorok kevésbé képesek kompenzálni a károsodást idős korban, több faktornak a kompenzatorikus emelkedése (pl. BDNF, GDNF) is elmarad idős korban (Yurek et al., 2001). Ezen faktorok összessége magyarázhatja azokat a megfigyeléseket, miszerint a neuroprotektív stratégiák nem annyira hatékonyak idős korban (Collier et al., 1999; Connor et al., 1996; Sortwell et al., 2001).

Fordítva, a nőstényekben meglévő nagyobb mértékű endogén neuroprotektáció magyarázhatja, hogy a PACAP kezelés nem volt annyira hatékony, mint hímekben. Ezzel kapcsolatban jóval szerényebb irodalmi adatok állnak rendelkezésre. Csupán néhány közlemény számol be hasonló megfigyelésekről, miszerint a hímekben hatékony neuroprotektív kezelés nőstényekben nem vezetett eredményre. Neurotrauma modellben írták le, hogy a kontúzió nagysága jóval kisebb volt nőstény patkányokban, és ezt nem csökkentette tovább a hímekben rendkívül hatékony hypothermia (Suzuki et al., 2003). Ezt a szerzők azzal magyarázzák, hogy a nemi hormonok hasonló útvonalon fejtenek ki védő hatást, mint a hypothermia, ezért a károsodás eleve kisebb mértékű, és nem fokozható tovább hypothermiával. Mások leírták, hogy opioid agonisták védnek cerebrális ischaemiában hímekben, de nőstényekben nem (Chen et al., 2005; Zeynalov et al., 2006). Egér MPTP Parkinson-kór modellben azt találták, hogy a koffein csak hímekben és ovariectomizált nőstényekben csökkentette a lézió mértékét (Xu et al., 2006). A mi megfigyeléseink is ezen megfigyelések körét bővítik: a PACAP kezelés hatékony volt hímekben és ovariectomizált nőstényekben, de csupán kisfokú magatartási javulást tapasztaltunk nőstényekben és kasztrált hímekben. Bár nem tartozik szorosan

ehhez a témához, de legújabb eredményeink szerint a PACAP hasonló mértékű protektív hatást fejt ki szívizomsejtekben, mint a prekondicionálás, azonban a két hatás együtt már nem erősíti tovább a protektív hatást. Valószínűleg mindkét kezelés hasonló mechanizmussal működik és hatásuk már nem összegződik (Röth et al., 2009). Mindezen megfigyelések arra is felhívják a figyelmet, hogy a neuroprotektív anyagok hatékonyságát az állatok kora és neme jelentős mértékben befolyásolják, és nem elegendő fiatal hím állaton tesztelni a potenciális protektív szereket.

A PACAP hatása striatális neuronpusztulásban

Kísérletünkben bebizonyítottuk, hogy a quinolinsav léziót megelőző PACAP kezelés felére csökkentette a károsodott sejtek számát a striatumban, megakadályozta a hiperaktivitás kialakulását, és elősegítette a féloldali lézió következtében kialakuló aszimmetrikus jelek gyors javulását (Tamás et al., 2006). A kísérlet során észlelt sejtkárosodás mértéke nagymértékben eltért korábban a Parkinson-kór modellben a substantia nigra területén észlelt közel 80%-os sejtpusztulástól (Mokrey, 1995; Schwarting és Huston, 1996a,b). Ez azzal magyarázható, hogy kísérletünk során a NADPH-diaforáz festést alkalmaztuk, amely a közepes méretű tüske nélküli neuronokat festi, amelyek relatíve megkíméltebbek a quinolinsav lézió során (Beal et al., 1986; Roberts et al., 1993). Azért választottuk mégis ezt a léziót, mert az így létrejött striatális károsodás modellezi legjobban az emberi Huntington-chorea pathomorfológiai sajátosságait. Ezen sejtek károsodásának hátterében az állhat, hogy az állatmodellben alkalmazott excitátoros aminosav túlingerli a neurotranszmittereket termelő sejteket, ami a sejtek pusztulása után a betegsége jellemző tünetegyüttest hoz létre (Beal et al., 1986; Roberts et al., 1993). PACAP kezelés hatására megközelítőleg fele annyi sejt pusztult el a lézió után, mint a kontroll állatokban, ezzel magyarázhatóak a PACAP-pal kezelt állatok szignifikánsan jobb neurológiai tünetei. A Parkinson-kór modellben elért eredményekhez hasonlóan itt is az alacsonyabb dózis volt a hatékonyabb, míg a nagyobb dózis esetében a kontroll állatokhoz hasonló hiperaktivitást találtunk a motoros aktivitás vizsgálata során. Mint ahogy azt már a korábbi fejezetekben részletesen leírtuk, ezen eredmények hátterében a PACAP dózisfüggő hatása (Arimura, 2003; Morio et al., 1996), valamint a magasabb koncentrációjú PACAP aktivitást fokozó hatása állhat (Masuo et al., 1995).

Különböző neonatális kezelések hatása az idegrendszer fejlődésére és a PACAP hatásának vizsgálata

A perinatális időszak alapvető fontosságú az idegrendszer fejlődésében. Az ebben az időszakban bekövetkező károsító hatások súlyos következményekkel járhatnak, melyek a felnőtt élet minőségét is befolyásolhatják (Katona, 2001). A hypoxiás/ischaemiás és különféle toxikus léziók hosszútávú hatásai számos vonatkozásban jól ismertek (Berger és Garnier, 1999). Azonban a korai, közvetlenül a posztnatális időszakot érintő változásokról keveset tudunk annak ellenére, hogy az irodalomban már felhívták a figyelmet a korai elváltozások prognosztikai jelentőségére (Ten et al., 2003). Ismertek az idegrendszer fejlődését károsan befolyásoló tényezők, mint alultápláltság, posztnatális stressz, hypoxia/ischaemia és toxikus léziók, valamint az idegrendszer fejlődését elősegítő körülmények, mint trophicus faktorok és ingergazdag környezet.

Részletesen leírtuk az újszülött patkányok idegrendszerei fejlődését neonatális PACAP és PACAP antagonistá kezelések követően, valamint toxikus és hypoxiás károsodásban (III.4. fejezet). Az összeállított tesztskála megbízhatónak bizonyult a neuronális fejlődést késleltető hatások vizsgálatára. Természetesen az igen összetett reflexfejlődési és motoros fejlődési mintázat alakulását rendkívül sok tényező befolyásolja, mint a genetikai háttér, tápláltsági állapot, környezeti ingerek, stressz, maternális hatások (Archer és Frederiksson, 2007; Eriksson et al., 2001; Palomo et al., 2003; Smart and Dobbing, 1971a,b), azonban a vizsgálataink során mindig egyidőben végzett, kevert almokkal kísérleteztünk az egyéb faktorok minimalizálása érdekében. Megállapítottuk, hogy mind a PACAP antagonistá, a glutamát kezelés, és a hypoxiás/ischaemiás károsodás késlelteti egyes neurológiai reflexek és a motoros koordináció fejlődését. Valószínűleg a korai idegrendszer fokozott plaszticitásának köszönhetően a legtöbb jelben a megfigyelési idő végére a kezelt állatok már a kontrollokéhoz hasonló teljesítményt nyújtottak. Kivételt képezett a lépéshiba teszt, mely során a kezelt állatok a megfigyelési idő végéig rosszabb teljesítményt nyújtottak. Hasonló megfigyelést tettünk a legutóbbi vizsgálatainkban neonatális asphyxia modellben, ahol a késleltetés jóval súlyosabb fokú volt, mint a másik két lézió modellben: egyes reflexek 3-4 nappal is később jelentkezték, azonban a tartós magatartási zavart itt is legjobban a lépéshiba teszt mutatta (Kiss et al., 2009). Ellenkezőleg, neonatális stressz

modellben (maternális depriváció) nem találtunk lényeges eltérést a kontrollokhöz képest, ami arra utalhat, hogy a neonatális stressz hatásai csak később jelentkeznek (Farkas et al., 2009). Hasonló megfigyeléseket mások is tettek, azonban ennyire összetett vizsgálatsorozatban nem számoltak be a hypoxia, a glutamát vagy a trophicus faktor kezelések hatásairól (Duboviczky et al., 1997; Squibb et al., 1981; Ten et al., 2003). A PACAP antagonisták késleltető hatását tovább megerősíti az a leírás, miszerint a VIP antagonisták kezelése is jelentősen késlelteti a reflexfejlődést (Hill et al., 1991). MSG kezelésben vizsgáltuk az újdonságkereső magatartást is. Ebben azt figyeltük meg, hogy a glutamát kezelés hatására az állatok teljesen ellentétes magatartást tanúsítanak az új tárgy jelenlétében, mint kontroll társaik. A kontroll állatokban tapasztalt viselkedés, miszerint kifejezett érdeklődést mutattak az új tárgy iránt, összhangban van korábbi leírásokkal (Heyser et al., 2004). Az MSG kezelés ilyen hatása azonban korábban nem volt ismert. Az eltérő viselkedés hátterében összetett mechanizmusok állhatnak, hiszen az MSG kezelés ismerten több olyan agyterületen is károsodást okoz, melyek ebben a magatartásmintában hatással lehetnek (pl. hippocampus, frontális kéreg) (Gonzalez-Burgos et al., 2001; Kubo et al., 1993).

Ezen vizsgálataink elsődleges célja az volt, hogy egy megbízható tesztrendszert állítsunk fel, melynek segítségével a későbbiek során neuroprotektív szerek, köztük a PACAP hatását a neonatális késleltetett fejlődésre vizsgálni tudjuk. A PACAP az idegrendszeri reflexfejlődést gyorsította. Az, hogy ezen hatás a felnőttkorban más viselkedésbeli vagy kognitív teljesítménybeli eltérésekhez is vezet-e, nem ismert, azonban mindenképpen igazolja azt, hogy a PACAP-nak *in vivo* neurotrophicus hatásai vannak. Lényeges megfigyelés, hogy a PACAP az MSG-okozta késleltetett fejlődést enyhe mértékben csökkenteni tudta. Ez további vizsgálatok alapját képezi, jelenleg a PACAP kezelés hatásait vizsgáljuk hypoxia/ischaemia és asphyxia modellekben, ahol a neurológiai késleltetett fejlődés jóval kifejezettebb volt, mint a glutamát kezelés esetén.

A PACAP SZERVEZETBEN TÖRTÉNŐ METABOLIZMUSA, VÉR-AGY GÁTON VALÓ ÁTJUTÁSA ÉS LEHETSÉGES DIAGNOSZTIKAI JELENTŐSÉGE

A PACAP-nál, mint 38 aminosavból álló peptidnél, fontos kérdés a vér-agy gáton való átjutás, illetve a szervezetbe való bejutáskor a peptid féléletideje. A peptidet a dipeptidil peptidáz IV bontja le, és nagyon rövid felezési ideje (percek) van testfolyadékokban (Bourgault et al., 2008a). Peptidáz KO egereknél a PACAP clearance sokkal lassabb (Zhu et al., 2003). A degradáció során N-terminális rövidebb peptidek keletkeznek, melyek már biológiailag nem aktívak (Bourgault et al., 2008a,b). Az N-terminális vég szükséges a biológiai aktivitáshoz, de a receptorkötéshez nem, és az így keletkezett peptidek antagonistaként viselkednek a legtöbb esetben (Bourgault et al., 2008a,b). Ezen rövidebb fragmensek közül a leghatásosabb antagonista a PACAP6-38 (Vandermeers et al., 1992). Azonban, mint saját eredményeink mutatják, ez sem minden sejt esetében igaz, mint pl. trophoblast sejtek esetében, ahol azt találtuk, hogy a PACAP6-38 teljesen hasonló módon aktiválja a jelátviteli utakat, mint a PACAP1-38. Ezen utóbbi közleményben számoltunk be arról is, hogy a PACAP6-38 a tracheában a felszabaduló gyulladásos neuropeptidekre is a PACAP1-38-cal agonista módon hat, és nem antagonistaként (Reglődi et al., 2008).

A gyors metabolizmus ellenére a PACAP *in vivo* számos hatást fejt ki, melynek részletes magyarázata még további vizsgálatokat igényel. A PACAP struktúrája sok egyedülálló tulajdonsággal rendelkezik, mely részben magyarázhatja szerteágazó biológiai hatásait a gyors degradáció ellenére. Ilyen a konformációs flexibilitása és a foszfolipid membránokhoz való kötődése utáni nagyfokú stabilitása, mely a további degradációt megakadályozza (Komi et al., 2007; Krishnadas et al., 2003). Az utóbbi időben tömegspektrometriai és RIA analízissel mi is vizsgálni kezdtük a PACAP jelenlétét és metabolizmusát testfolyadékokban. Előzetes eredményeink azt mutatják, hogy a PACAP magas koncentrációban található az anyatejben és ellenáll a proteázoknak, aminek hátterében álló mechanizmusok még nem ismertek (Börzsei et al., közlés alatt).

A PACAP átjutása a vér-agy gáton már régóta ismert volt. A PACAP a peptid transzport rendszer-6 segítségével jut át a vér-agy gáton, az agyban regionális

különbségeket mutatva (Banks et al., 1993; Nonaka et al., 2002). A különböző pathológiás állapotok, melyek a vér-agy gátat dinamikusan változtatják, a PACAP transzportot ugyancsak befolyásolják. Csökken a PACAP vér-agy gáton való átjutása endotoxémiában, kezdeti csökkenés után növekszik gerincvelő sérülésben, globális ischaemiában pedig nem változik a vér-agy gát PACAP permeabilitása szemben a vér-gerincvelő gáttal, ahol növekedés volt tapasztalható (Banks et al., 1998; Mizushima et al., 1999; Nonaka et al., 2002). Saját korábbi eredményeink azt mutatják, hogy fokális ischaemiában is változik a PACAP bejutása az agyba: korai emelkedés után csökkenést mértünk (Somogyvári-Vigh et al., 2000). A vér-agy gáton való átjutás és a gyors felezési idő magyarázhatja azon, részben saját megfigyeléseket, miszerint a PACAP szisztémás hatékonyságához folyamatos infúziós kezelés volt szükséges, mint pl. stroke modellben és myelomás vesekárosodásban (Li et al., 2007; Reglődi et al., 2000). Ezzel szemben egyszeri szisztémás adás csak enyhe hatást fejtett ki az idegrendszerben, mint pl. az MSG-indukálta retinadegenerációs modellben (Kiss et al., 2006), ellentétben az erőteljes lokális hatékonysággal. Lokális, illetve icv kezelésekkel vizsgálatainkban jelentős protektív hatást tudtunk kimutatni stroke, neurodegeneratív betegségek modelljeiben és retinadegenerációban egyaránt (III.1., 2. és 3. fejezetek).

A vér-agy gát éretlensége, és ezzel feltételezhetően magasabb agyi PACAP koncentráció magyarázhatja azt, hogy szisztémás PACAP kezelés jelentős hatást fejtett ki neonatális szisztémás kezelésekkor saját, és mások munkáiban (Kiss et al., 2006; Reglődi et al., 2003; Szabó et al., 2002). Az utóbbi években tanulmányoztuk a PACAP perifériás és centrális hatásait neurogén és nem neurogén gyulladásos folyamatokban, ahol azt találtuk, hogy a PACAP szint kapszaicin-szenzitív perifériás idegvégződések ingerlése hatására növekszik a plazmában, és számos gyulladásgátló hatást fejt ki (Helyes et al., 2007; Németh et al., 2006; Sándor et al., 2008). Ugyancsak új megfigyelésünk, hogy szisztémás adáskor a PACAP a könnyű fehérjeösszetételét is befolyásolni képes (Gaál et al., 2008). Az értekezéshez tartozó eredmény, mely szerint a PACAP egyszeri szisztémás adása jelentős protektív hatást fejtett ki vese ischaemiás károsodásban, a fenti megfigyelésekhez hasonlóan magyarázható: a perifériás szervekbe könnyebben bejut a PACAP, mint a központi idegrendszerbe, és azonnali aktivációs folyamatokon keresztül hosszantartó hatást képes kifejteni (Szakály et al., 2008).

Számos próbálkozás van folyamatban, melyek a PACAP központi idegrendszeri bejutását, illetve nagyobb stabilitását igyekeznek fokozni. Legújabb irodalmi adatok beszámolnak az agyi endothelsejtek agy-vér irányú transzportért felelős peptid transzport rendszer-6 efflux komponensének azonosításáról és gátlásáról, mely a PACAP neuroprotektív hatását fokozza (Dogrukol-Ak et al., 2008). A PACAP adenovírus-mediálta idegrendszerbe való jutattásáról is az utóbbi időben számoltak be, mely terápiás szempontból jelentős lehet (Sanchez et al., 2008). Törekvések vannak arra vonatkozóan is, hogy a PACAP szájnyálkahártyán való felszívódását fokozzák mucoadhesiv konjugációval (Langoth et al., 2005, 2006), illetve inhalációs készítményekkel segítsék elő a bejutást (Doberer et al., 2007). Ugyancsak ígéretes és kíváncsú próbálkozás, a PACAP fragmenseinek vizsgálata, a fragmensek módosítása és ezzel peptidáz rezisztenssé tétele, valamint hatékony nem-peptid PACAP receptor analógok kifejlesztése. Ezzel kapcsolatban is csak a legutóbbi időben születtek eredmények. Tanulmányozták különböző oldószerekben a peptid stabilitását (Severs et al., 2008) és azonosítottak két, kismolekulájú, nem peptid hidrazid származékot, melyek erőteljes PAC1 receptor antagonisták (Beebe et al., 2008). Mint már fent említettem, az N-terminális vég rövidítése a biológiai aktivitást csökkenti, és antagonizálja a PAC1 receptor hatást. Ezzel szemben a C-terminális vég rövidítése a receptoriális kötést csökkenti, de egyben stabilabb szerkezetet eredményez, mivel jobban ellenáll a peptidázoknak (Bourgault et al., 2008b). Újabb munkáinkban összehasonlítottuk a szervezetben előforduló két aktív forma (PACAP1-38 és 1-27), valamint a két leggyakrabban alkalmazott antagonistát (PACAP6-38, 6-27) hatását retina MSG-indukálta lézióban (Atlasz et al., 2009). Általában a két aktív forma hasonló biológiai aktivitással rendelkezik, bár ismert ellentétes hatás is (Kántor et al., 2000). Mi egyforma protektív hatást találtunk a két aktív forma alkalmazásakor, míg a két antagonistát nemcsak az agonisták hatását blokkolta, hanem önmagukban tovább fokozták az MSG toxikus hatását. A legutóbbi időben két olyan módosított peptidszármazékot fejlesztettek ki (acetyl-Ala¹⁵,Ala²⁰PACAP38-propylamid és acetyl-PACAP27-propylamid), melyek biológiai aktivitással rendelkeznek, de ellenállnak a peptidázoknak (Bourgault et al., 2008b). Kollaborációs kapcsolatot alakítottunk ki ezzel a munkacsoporttal az *in vivo* hatékonyság tesztelése céljából. Ezen munkák jelenleg folyamatban vannak.

Hasonlóan fontos a jövőbeli humán gyógyászatban való felhasználhatóság szempontjából a PACAP diagnosztikus vizsgálata. Számos közleményben leírják a PACAP lokális szövetbeli változásait különböző módszerek felhasználásával. Néhány közlemény beszámol szérumban való mérésről is, ez azonban széles körben nem terjedt el valószínűleg a gyors lebomlás és alacsony szérumszint miatt. Az elmúlt években munkacsoportunk kidolgozott egy érzékeny és szelektív RIA módszert (Jakab et al., 2004; Németh et al., 2007), melynek segítségével számos szövetben vizsgáltuk a PACAP jelenlétét és változását különböző behatásokra. Kimutattuk, hogy az agyi PACAP szint érzékenyen reagál éhezésre, szomjazásra, gonadektómiára és pinealektómiára. Több fajban kimutattuk a PACAP előfordulását és változásait különböző ingerekre, mint pl. trágyagiliszta dúcléc átvágáskor fokozódik a PACAP expresszió, csigában hibernáció idején jelentősen csökken, valamint csirke idegrendszerben napi ritmusváltozást mutat, azonban ezek részletezése nem képezik jelen értekezés témáját (Boros et al., 2008; Hernádi et al., 2008; Józsa et al., 2001, 2006a,b; Kiss et al., 2007; Németh et al., 2006; Somogyvári-Vigh et al., 2002; Várhalmi et al., 2008). A teknős idegrendszerben kimutatott, a patkány hasonló agyterületeiben mért PACAP szinteket 10-100-szorosan meghaladó szintek kimutatása tartozik az értekezés témájához, hiszen ez egy lehet a sok faktor közül, mely a teknős rendkívüli anoxia tűrőképességét magyarázza (Reglódi et al., 2001). A PACAP direkt hatásait is igazoltuk teknős retina szeleteken (Rábl et al., 2002). Egy 2008-ban megjelent kézikönyvben ezt, mint már valóban lehetséges protektív faktort tárgyalják a szerzők, ami hozzájárulhat a teknős igen nagy anoxia tűrőképességéhez (Wyneken et al., 2008). Az általunk kifejlesztett RIA technikával nemcsak szöveti PACAP szinteket tudunk mérni, hanem segítségével patkány és humán szérumban, és anyatejben is megbízhatóan tudunk PACAP szintet mérni (Börzsei et al., közlés alatt; Helyes et al., 2007). A jövőben ennek továbbfejlesztése és klinikai alkalmazhatóságának vizsgálata a célunk. Mindezen eredmények és törekvések arra utalnak, hogy igény van arra, hogy a PACAP ígéretes neuroprotektív és egyéb hatásait humán gyógyászatban is hozzáférhetővé tegyék, és reményt adnak arra, hogy az állatkísérletekben tapasztalt hatásoknak a humán gyógyászat is hasznát veszi.

V. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Kísérletes stroke modellben igazoltuk a PACAP neuroprotektív hatását permanens fokális agyi ischaemiában, intracerebroventrikuláris beadás esetén. Részletes funkcionális vizsgálattal megállapítottuk, hogy a leggyakrabban vizsgált neurológiai tünetek az infarktus magjának károsodásából adódó lézió súlyosságát jelzik. A neuroprotektív szerek általában, így a PACAP is, a penumbális terület csökkenéséhez vezetnek, ezért a leggyakrabban alkalmazott tesztek a neuroprotektív szerek vizsgálatára csak limitáltan alkalmazhatók. PACAP esetében finomabb orientációs tesztekkel kimutattuk, hogy a peptid nemcsak az infarktus nagyságát, hanem a funkcionális károsodást is képes csökkenteni. Ezenfelül igazoltuk, hogy a PACAP átmenetileg fokozza a lokális agyi véráramlást.

2. A Parkinson-kór modelljeként használt substantia nigra károsított állatokban részletes magatartási és morfológiai analízissel kimutattuk, hogy a lézió kimenete nagymértékben függ a kortól és nemtől. Legnagyobb károsodást a fiatal és idős hímek mutatnak, míg nőstényekben a dopaminerg sejtek pusztulása és a magatartási zavarok is jóval enyhébbek. Idős állatokban, mindkét nemben a dopaminerg sejtek pusztulásának mértéke nem különbözik a fiatalokétól, de a funkcionális károsodás súlyosabb. Hasonlóan, az ovariektómia nem befolyásolja a sejtpusztulás mértékét a substantia nigrában, azonban a spontán funkcionális javulás nem olyan mértékű, mint nem ovariektomizált nőstényekben. A kasztráció a hímekben csökkenti a dopaminerg sejtek pusztulását, de ez nem tükröződik funkcionális javulásban.

3. Parkinson-kór modellben igazoltuk, hogy a PACAP jelentős neuroprotektív hatással rendelkezik 6-OHDA-indukálta substantia nigra roncsolásban. Kimutattuk, hogy a neurotoxikus lézió előtt a substantia nigrába beadott PACAP megvédi a dopaminerg sejtek közel 50%-át a substantia nigrában, és a sejtek csaknem 100%-át a ventrális tegmentális areában, a kontroll oldallal összehasonlítva. A PACAP-pal kezelt állatok szignifikánsan jobban teljesítenek a magatartási tesztekben, nem mutatnak súlyos hypoaktivitási jeleket, és az aszimmetrikus tünetek is szignifikánsan gyorsabban

javulnak, mint a kontroll csoportban. Igazoltuk, hogy a PACAP neuroprotektív hatása függ a kortól és a nemtől. Legkifejezettebb fiatal és idős hímekben. Nőstényeknél a sejtpusztulás mértékét nem befolyásolja a PACAP kezelés, de enyhe magatartási javulást eredményez. A substantia nigra léziót megelőző PACAP kezelés kasztrált hímekben csak a magatartási jeleket javítja kis mértékben, míg ovariectomizált nőstényekben a dopaminerg sejtek pusztulását is csökkenti.

4. Bizonyítottuk, hogy a quinolinsav léziót megelőző PACAP kezelés felére csökkenti a károsodott sejtek számát a striatumban, megakadályozza a hiperaktivitás kialakulását, és elősegíti a féloldali lézió következtében kialakuló aszimmetrikus tünetek gyors javulását.

5. A PACAP kezelés erőteljes retinoprotektív hatását igazoltuk glutamát indukálta újszülöttkori retinadegenerációban és felnőttkori bilaterális carotis lekötéssel kiváltott ischaemiás károsodásban. Igazoltuk az endogén PACAP védő hatását, mivel a PACAP antagonistá kezeléssel a toxikus léziót tovább súlyosbítja. Teknős idegrendszerében az emlősével összehasonlítva 10-100-szoros PACAP koncentrációt mértünk. Horizontális sejtek fényválaszai alapján igazoltuk, hogy a PACAP jelentős retinoprotektív hatást fejt ki oxigénmentes környezetben a teknős retinában.

6. Patkány újszülöttkori idegrendszeri fejlődését vizsgálva kimutattuk, hogy a neonatális excitotoxikus lézió jelentősen késlelteti a neuronális fejlődést és teljesen megváltoztatja az újdonságkereső magatartást. Részletesen leírtuk az újszülöttkori hypoxiás/ischaemiás károsodás idegrendszeri fejlődést késleltető hatását is. A PACAP fejlődésben kifejtett szerepét *in vivo* vizsgálatokkal igazoltuk. Újszülöttkori PACAP kezelés az idegrendszer fejlődését serkenti, míg PACAP antagonistá enyhén gátolja. Az idegrendszer fejlődésének MSG-indukálta késését a PACAP kezelés csökkenti. *In ovo* csirkeembriók PACAP antagonistá kezelésével igazoltuk, hogy a PACAP embrionális gátlása átmeneti aktivitási eltéréseket eredményez és tartós negatív hatása van a szociális magatartásra.

7. A neuroprotekciónak molekuláris hatásmechanizmusát vizsgálva igazoltuk, hogy a retinában kifejtett védő hatás hátterében a PACAP erőteljesen antiapoptotikus hatása áll.

A PACAP *in vivo* gátolja a proapoptotikus jelátviteli utakat és serkenti az antiapoptotikus molekulákat. *In vivo* a PACAP csökkenti a proapoptotikus jelátviteli molekulák, a JNK, és kaszpáz-3 aktivációs szintjét, valamint az AIF és citokróm *c* transzlokációt a retinában, illetve növeli az antiapoptotikus foszfo-ERK, foszfo-CREB és foszfo-Bad szintjét. Elsőként igazoltuk a PACAP hatását a PKA/Bad/14-3-3 jelátviteli útvonalra. Fokális cerebrális ischaemiában a PACAP *in vivo* antiapoptotikus hatását is észleltük. Továbbá kimutattuk, hogy a PACAP igen széles koncentrációtartományban csökkenti a PC12 sejtek apoptózisát, de ez a hatás jelentősen mérséklődik PKA mutáns sejtekben.

8. Igazoltuk, hogy a PACAP nemcsak neuroprotektív, hanem általános citoprotektív hatásokkal is rendelkezik. Vese ischaemiában szisztémás PACAP kezelés jelentősen csökkenti a mortalitást és a tubuláris károsodás mértékét. Igazoltuk, hogy a PACAP szívizom- és endothelsejtekben, valamint egy gerinctelen faj (éti csiga) nyálmirigyében antiapoptotikus hatással rendelkezik. A proapoptotikus jelátviteli utakat gátolja, míg az antiapoptotikus jelátviteli utakat serkenti. Szívizomsejtekben igazoltuk, hogy a PACAP gátolja a sejtpusztulást elősegítő citokróm *c* transzlokációt és a kaszpáz-3 aktivációt, valamint serkenti a védő PKA/Bad/14-3-3, PKA/Akt/14-3-3 útvonalakat és aktiválja a Bcl-xL-t és Bcl-2-t. Endothelsejtekben a PACAP növeli a védő hatású ERK aktivációt, míg gátolja a proapoptotikus JNK és p38 MAP kinázok aktivációját.

9. Trophoblast sejtekben kimutattuk, hogy a PACAP, szemben más sejtekben tapasztalt védő hatásával, nem citoprotektív. Ellenkezőleg, a PACAP potenciózza az oxidatív stressz és *in vitro* hypoxia károsító hatását. Mindennek háttérében az állhat, hogy a trophoblast sejtekben eltérnek a jelátviteli utak a más, vizsgált sejtekben leírtaktól. Azt is kimutattuk, hogy a PACAP6-38 trophoblast sejtekben nem antagonistaként, hanem agonistaként viselkedik.

Az eredmények hasznosíthatósága

Az értekezésben foglalt eredmények alapkutatás jellegűek, melyek során nagy populációt érintő, többfajta betegség (stroke, Parkinson-kór, Huntington-chorea, retinadegeneráció és toxikus újszülöttkori károsodás) állatkísérletes modelljében igazoltuk a PACAP

neuroprotektív hatását. A vizsgálatok során több, magát a modellt érintő megfigyelést tettünk, mely segítheti más neuroprotektív szerek hatékonyabb állatkísérletes tesztelését. Igazoltuk továbbá, hogy a PACAP nemcsak az idegrendszeri károsodást mérsékli, hanem endothel és szívmuszkárosodásban *in vitro*, és vese ischaemiában *in vivo* is protektív hatású. A perinatális idegrendszeri károsodásokat vizsgálva részletesen leírtuk több károsító tényező idegrendszeri fejlődést késleltető hatását, mely a jövőben kidolgozandó protektív eljárások tesztelésének alapjául szolgálhat. Leírtuk az *in vivo* neuroprotektív hatás háttérében álló molekuláris mechanizmusokat. Ezek megismerése további, a PACAP receptorokon ható, vagy más, hasonló mechanizmussal működő molekulák kifejlesztéséhez nyújthat háttérrel. A közelmúltban elkezdett PACAP analógokkal és fragmensekkel történő vizsgálatok átvezetést jelenthetnek a humán alkalmazhatóság felé. További terveink között szerepel nem-peptid analógok kifejlesztése és tesztelése. Munkacsoportunk jelenleg is folytat olyan kísérleteket, melyek a PACAP endogén neuroprotektív és általános protektív szerepének feltárásával remélhetőleg elősegítik a humán diagnosztikában is alkalmazható vizsgálatok kidolgozását.

VI. IRODALOM

Abad C, Gomariz RP, Waschek JA. Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP. *Curr Top Med Chem* 2006; 6: 151-163.

Adamik A, Telegdy G. Involvement of different receptors in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induced open field activity in rats. *Neuropeptides* 2004; 38: 16-20.

Adamik A, Telegdy G. Effects of pituitary adenylate cyclase polypeptide (PACAP) on extinction of active avoidance learning in rats: involvement of neurotransmitters. *Regul Pept* 2005; 127: 55-62.

Agarwal A, Halvorson LM, Légrádi G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Mol Brain Res* 2005; 138: 45-57.

Ali SF, David SN, Newport GD. Age-related susceptibility to MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology* 1993; 14: 29-34.

Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, Hurn PD. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke* 1998; 29: 159-165.

Allais A, Burel D, Isaac ER, Gray SL, Basille M, Ravni A, Sherwood NM, Vaudry H, Gonzalez BJ. Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 2604-2618.

Altman J, Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav* 1975; 23: 896-920.

Anzai M, Suzuki Y, Takayasu M, Kajita Y, Mori Y, Seki Y, Saito K, Shibuya M. Vasorelaxant effect of PACAP-27 on canine cerebral arteries and rat intracerebral arterioles. *Eur J Pharmacol* 1995; 285:173-179.

Apa R, Lanzzone A, Miceli F, Vaccari S, Macchione E, Stefanini M, Canipari R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide modulates plasminogen activator expression in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 2002; 66: 830-835.

Apostolakis EM, Lanz R, O'Malley BW. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of steroid-induced reproductive behavior in female rodents. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 173-183.

Archer T, Frederiksson A. Behavioural supersensitivity following neonatal 6-hydroxydopamine: attenuation by MK-801. *Neurotox Res* 2007; 12: 113-124.

Arimura A. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol* 1998; 48: 301-331.

Arimura A. Perspectives on the development of a neuroprotective drug based on PACAP. *Regul Pept* 2003; 115: 40 (abstract).

Arimura A. PACAP: the road to discovery. *Peptides* 2007; 28: 1617-1619.

Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 1991; 129: 2787-2789.

Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Weill C, Fiore RC, Tatsuno I, Bay V, Brenneman DE. PACAP functions as a neurotrophic factor. *Ann NY Acad Sci* 1994; 739: 228-243.

Arimura A, Li M, Batuman V. Potential protective action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP38) on in vitro and in vivo models of myeloma kidney injury. *Blood* 2006; 107: 661-668.

Armstrong BD, Hu Z, Abad C, Yamamoto M, Rodriguez WI, Cheng J, Tam J, Gomariz RP, Patterson PH, Waschek JA. Lymphocyte regulation of neuropeptide gene expression after neuronal injury. *J Neurosci Res* 2003; 74: 240-247.

Armstrong BD, Abad C, Chhith S, Cheung-Lau G, Hajji OE, Nobuta H, Waschek JA. Impaired nerve regeneration and enhanced neuroinflammatory response in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating peptide. *Neuroscience* 2008; 151: 63-73.

Aubert N, Falluel-Morel A, Vaudry D, Xifro X, Rodriguez-Alvarez J, Fisch C, de Jouffrey S, Lebigot JF, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. PACAP and C2-ceramide generate different AP-1 complexes through a MAP-kinase-dependent pathway: involvement of c-Fos in PACAP-induced Bcl-2 expression. *J Neurochem* 2006; 99: 1237-1250.

Aubert N, Basille M, Falluel-Morel A, Vaudry D, Buchares C, Jolivel V, Fisch C, De Jouffrey S, Le Bigot JF, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Molecular, cellular, and functional characterizations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors in the cerebellum of New and Old World monkeys. *J Comp Neurol* 2007; 504: 427-439.

Aubert N, Vaudry D, Falluel-Morel A, Desfeux A, Fisch C, Ancian P, de Jouffrey S, Le Bigot JF, Laburthe M, Fournier A, Laudénbach V, Vaudry H, Gonzalez BJ. PACAP prevents toxicity induced by cisplatin in rat and primate

neurons but not proliferating ovary cells: involvement of the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiol Dis* 2008; 32: 66-80.

Azcoitia I, DonCarlos LL, Garcia-Segura LM. Estrogen and brain vulnerability. *Neurotox Res* 2002; 4: 235-245.

Ábrahám H, Somogyvári-Vigh A, Maderdrut JL, Vigh S, Arimura A. Filament size influences temperature changes and brain damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Exp Brain Res* 2002; 142: 131-138.

Ábrahám H, Somogyvári-Vigh A, Maderdrut JL, Vigh S, Arimura A. Rapidly activated microglial cells in the preoptic area may play a role in the generation of hyperthermia following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *Exp Brain Res* 2003; 153: 84-91.

Ádám V. *Orvosi Biokémia. Medicina Könyvkiadó RT. Budapest, 2001.*

Banks WA, Kastin AJ, Komaki G, Arimura A. Passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-27 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-38 across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Therap* 1993; 267: 690-696.

Banks WA, Kastin AJ, Arimura A. Effect of spinal cord injury on the permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to the neurotrophin PACAP. *Exp Neurol* 1998; 151: 116-123.

Barberi M, Muciaccia B, Morelli MB, Stefanini M, Cecconi S, Canipari R. Expression localization and functional activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, vasoactive intestinal polypeptide and their receptors in mouse ovary. *Reproduction* 2007; 134: 281-292.

Barthó L, Lázár Z, Lénárd L, Benkó R, Tóth G, Penke B, Szolcsányi J, Maggi CA. Evidence for the involvement of ATP, but not of VIP/PACAP or nitric oxide, in the excitatory effect of capsaicin in the small intestine. *Eur J Pharmacol* 2000; 392: 183-188.

Basille M, Falluel-Morel A, Vaudry D, Aubert N, Fournier A, Fréger P, Gallo-Payet N, Vaudry H, Gonzalez B. Ontogeny of PACAP receptors in the human cerebellum: perspectives of therapeutic applications. *Regul Pept* 2006a; 137: 27-33.

Basille M, Cartier D, Vaudry D, Lihmann I, Fournier A, Freger P, Gallo-Payet N, Vaudry H, Gonzalez B. Localization and characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the human cerebellum during development. *J Comp Neurol* 2006b; 496: 468-478.

Beal MF, Kowall NW, Ellison DE, Mazurek KJ, Swartz KJ, Martin JB. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 1986; 321: 168-171.

Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986; 17: 1304-1308.

Beebe X, Darczak D, Davis-Taber RA, Uchic ME, Scott VE, Jarvis MF, Stewart AO. Discovery and SAR of hydrazide antagonists of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor type 1 (PAC1-R). *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 2162-2166.

Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by an intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 1996; 27: 1616-1622.

Benedek A, Móricz K, Jurányi Z, Gigler G, Lévy G, Hársing LG Jr, Mátyus P, Szénási G, Albert M. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2006; 1116: 159-165.

Beresford IJ, Parsons AA, Hunter AJ. Treatments for stroke. *Expert Opin Emerg Drugs* 2003; 8: 103-122. Review.

Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Reviews* 1999; 30: 107-134.

Bhave SV, Hoffman PL. Phosphatidylinositol 3'-OH kinase and protein kinase A pathways mediate the anti-apoptotic effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in cultured cerebellar granule neurons: modulation by ethanol. *J Neurochem* 2004; 88: 359-369.

Birk S, Sitarz JT, Petersen KA, Oturai PS, Kruuse C, Fahrenkrug J, Olesen J. The effect of intravenous PACAP38 on cerebral hemodynamics in healthy volunteers. *Regul Pept* 2007; 140:185-191.

Borba JC, Henze IP, Silveira MS, Kubrusly RC, Gardino PF, de Mello MC, Hokoç JN, de Mello FG. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) can act as determinant of the tyrosine hydroxylase phenotype of dopaminergic cells during retina development. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 156: 193-201.

Botia B, Basille M, Allais A, Raoult E, Falluel-Morel A, Galas L, Jolivel V, Wurtz O, Komuro H, Fournier A, Vaudry H, Burel D, Gonzalez BJ, Vaudry D. Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* 2007; 28: 1746-1752.

Botia B, Seyer D, Ravni A, Bénard M, Falluel-Morel A, Cosette P, Jouenne T, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ, Vaudry D. Peroxiredoxin 2 is involved in the neuroprotective effects of PACAP in cultured cerebellar granule neurons. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 61-72.

- Bourgault S, Vaudry D, Botia B, Couvineau A, Laburthe M, Vaudry H, Fournier A. Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 2008a; 29: 919-932.
- Bourgault S, Vaudry D, Guilhaudis L, Raoult E, Couvineau A, Laburthe M, Ségala-Milazzo I, Vaudry H, Fournier A. Biological and structural analysis of truncated analogs of PACAP27. *J Mol Neurosci* 2008b; 36: 260-269.
- Braas KM, May V, Zwara P, Nausch B, Kliment J, Dunleavy JD, Nelson MT, Vizzard MA. Role for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in cystitis-induced plasticity of micturition reflexes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: 951-962.
- Braas KM, Schutz KC, Bond JP, Vizzard MA, Girard BM, May V. Microarray analyses of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-regulated gene targets in sympathetic neurons. *Peptides* 2007; 28: 1856-1870.
- Bramlett HM, Dietrich WD. Neuropathological protection after traumatic brain injury in intact female rats versus males or ovariectomized females. *J Neurotrauma* 2001; 18: 891-900.
- Brenneman DE. Neuroprotection: a comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Peptides* 2007; 28: 1720-1726.
- Brenneman DE, Hauser JM, Spong C, Phillips TM. Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity. *Neuropeptides* 2002; 36: 271-280.
- Brenneman DE, Phillips TM, Hauser J, Hill JM, Spong CY, Gozes I. Complex array of cytokines released by vasoactive intestinal peptide. *Neuropeptides* 2003; 37: 111-119.
- Bronson ME, Jiang W, Clark CR, DeRuiter J. Effects of designer drugs on the chicken embryo and 1-day-old chicken. *Brain Res Bull* 1994; 34: 143-150.
- Cameron DB, Galas L, Jiang Y, Raoult E, Vaudry D, Komuro H. Cerebellar cortical-layer-specific control of neuronal migration by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience* 2007; 146: 697-712.
- Campbell CA, Mackay KB, Patel S, King PD, Stretton JL, Hadingham SJ, Hamilton TC. Effects of isradipine, an L-type calcium channel blocker on permanent and transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Exp Neurol* 1997; 148: 45-50.
- Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2005; 2: 396-409.
- Canonica PL, Copani A, D'Agata V, Misco S, Petralia S, Travalì S, Stivala F, Cavallaro S. Activation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptors prevents apoptotic cell death in cultured cerebellar granule cells. *Ann NY Acad Sci* 1996; 805: 470-472.
- Cazillis M, Gonzalez BJ, Billardon C, Lombet A, Fraichard A, Samarut J, Gressens P, Vaudry H, Rostène W. VIP and PACAP induce selective neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 798-808.
- Chang JY, Korolev VV. Cyclic AMP and sympathetic neuronal programmed cell death. *Neurochem Int* 1997; 31: 161-167.
- Chang JY, Korolev VV, Wang JZ. Cyclic AMP and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) prevent programmed cell death of cultured rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 1996; 206: 181-184.
- Chen WH, Tzeng SF. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents cell death in the spinal cord with traumatic injury. *Neurosci Lett* 2005; 384: 117-121.
- Chen CH, Toung TJ, Hurn PD, Koehler RC, Bhardwaj A. Ischemic neuroprotection with selective kappa-opioid receptor agonist is gender specific. *Stroke* 2005; 36: 1557-1561.
- Chen Y, Samal B, Hamelink CR, Xiang CC, Chen Y, Chen M, Vaudry D, Brownstein MJ, Hallenbeck JM, Eiden LE. Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regul Pept* 2006; 137: 4-19.
- Chiodera P, Volpi R, Capretti L, Coiro V. Effects of intravenously infused pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on arginine vasopressin and oxytocin secretion in man. *Neuroreport* 1995; 6: 1490-1492.
- Ciani E, Hoffmann A, Schmidt P, Journout L, Spengler D. Induction of the PAC1-R (PACAP-type I receptor) gene by p53 and Zac. *Mol Brain Res* 1999; 69: 290-294.
- Ciarlo M, Bruzzone F, Angelini C, Vallarino M, Vaudry H. Ontogeny of PAC1-R and VPAC1-R in the frog, *Rana esculenta*. *Peptides* 2007; 28: 1738-1745.
- Collier TJ, Sortwell CE, Daley BF. Diminished viability, growth, and behavioral efficacy of fetal dopamine neuron grafts in aging rats with long-term dopamine depletion: an argument for neurotrophic supplementation. *J Neurosci* 1999; 19: 5563-5573.
- Connor B, Kozłowski DA, Schallert T, Tillerson JL, Davidson BL, Bohn MC. Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the striatum and substantia nigra of the aged Parkinsonian rat. *Gene Ther* 1996; 6: 1936-1951.
- Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Progr Neurobiol* 1998; 54: 531-548.

- Counis R, Laverrière JN, Garrel-Lazayres G, Cohen-Tannoudji J, Larivière S, Bleux C, Magre S. What is the role of PACAP in gonadotrope function? *Peptides* 2007; 28: 1797-1804.
- Csaba Zs, Csernus V, Gerendai I. Local effect of PACAP and VIP on testicular function in immature and adult rats. *Peptides* 1997; 18: 1561-1567.
- Dalsgaard T, Hannibal J, Fahrenkrug J, Larsen CR, Ottesen B. VIP and PACAP display different vasodilatory effects in rabbit coronary and cerebral arteries. *Regul Pept* 2003; 110: 179-188.
- Dam K, Seidler FJ, Slotkin TA. Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Dev Brain Res* 2000; 121: 179-187.
- Danovitch GM. *Handbook of Kidney Transplantation*. Lippincott Williams and Wilkins, 2005.
- Das M, Vihlen CS, Légrádi G. Hypothalamic and brainstem sources of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide nerve fibers innervating the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 2007; 500: 761-776.
- Davis-Taber R, Baker S, Lehto SG, Zhong C, Surowy CS, Faltynek CR, Scott VE, Honore P. Central pituitary adenylate cyclase 1 receptors modulate nociceptive behaviors in both inflammatory and neuropathic pain states. *J Pain* 2008; 9: 449-456.
- Dejda A, Sokołowska P, Nowak JZ. Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacol Rep* 2005; 57: 307-320.
- Dejda A, Jolivel V, Bourgault S, Seaborn T, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D. Inhibitory effect of PACAP on caspase activity in neuronal apoptosis: A better understanding towards therapeutic applications in neurodegenerative diseases. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 26-37.
- Delcourt N, Thouvenot E, Chanrion B, Galéotti N, Jouin P, Bockaert J, Marin P. PACAP type I receptor transactivation is essential for IGF-1 receptor signalling and antiapoptotic activity in neurons. *EMBO J* 2007; 26: 1542-1551.
- Delgado M, Ganea D. VIP and PACAP inhibit activation induced apoptosis in T lymphocytes. *Ann NY Acad Sci* 2000a; 921: 55-67.
- Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibit antigen-induced apoptosis of mature T lymphocytes by inhibiting Fas ligand expression. *J Immunol* 2000b; 164: 1200-1210.
- Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibit expression of Fas ligand in activated T lymphocytes by regulating c-Myc, NF- κ B, NF-AT, and early growth factors 2/3. *J Immunol* 2001; 166: 1028-1040.
- Delgado M, Garrido E, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptides (PACAP27 and PACAP38) protect CD4⁺CD8⁺ thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Blood* 1996; 12: 5152-5161.
- Delgado M, Jonakait GM, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia* 2002; 39: 148-161.
- Delgado M, Leceta J, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 155-164.
- Deutsch PJ, Sun Y. The 38-amino acid form of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates dual signaling cascades in PC12 cells and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem* 1992; 267: 5108-5113.
- DiCicco-Bloom E, Lu N, Pintar JE, Zhang J. The PACAP ligand/receptor system regulates cerebral cortical neurogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1998; 865: 274-289.
- Dickson L, Finlayson K. VPAC and PAC receptors: from ligands to functions. *Pharmacol Ther* 2009 in press
- Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9: 589-596.
- Dluzen D. Estrogen decreases corpus striatal neurotoxicity in response to 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 1997; 767: 340-344.
- Dluzen D, Horstink M. Estrogen as neuroprotectant of nigrostriatal dopaminergic system: laboratory and clinical studies. *Endocrine* 2003; 21: 67-75.
- Doberer D, Gschwandtner M, Mosgoeller W, Bieglmayer C, Heinzl H, Petkov V. Pulmonary and systemic effects of inhaled PACAP38 in healthy male subjects. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 665-672.
- Dobrev D, Bergstrasser E, Fischer HD, Andreas K. Restriction and functional changes of dopamine release in rat striatum from young adult and old rats. *Mech Ageing Dev* 1995; 80: 107-119.

- Dogrukol-Ak D, Kumar VB, Ryerse JS, Farr SA, Verma S, Nonaka N, Nakamachi T, Ohtaki H, Niehoff ML, Edwards JC, Shioda S, Morley JE, Banks WA. Isolation of peptide transport system-6 from brain endothelial cells: therapeutic effects with antisense inhibition in Alzheimer and stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; in press.
- Dohi K, Mizushima H, Nakajo S, Ohtaki H, Matsunaga S, Aruga T, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Regul Pept* 2002; 109: 83-88.
- Drahushuk K, Connell TD, Higgins D. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide inhibit dendritic growth in cultured sympathetic neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 6560-6569.
- Dubovicky M, Tokarev D, Skultetyova I, Jezova D. Changes in exploratory behavior and its habituation in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 56: 565-569.
- Dyker AG, Lees KR. Duration of neuroprotective treatment for ischemic stroke. *Stroke* 1998; 29: 535-542.
- El-Gehani F, Tena-Sempere M, Huhtaniemi I. Evidence that pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent regulator of fetal rat testicular steroidogenesis. *Biol Reprod* 2000; 63: 1482-1489.
- Emborg ME, Ma SY, Mufson EJ, Levey AI, Taylor MD, Brown WD, Holden JE, Kordower JH. Age-related declines in nigral neuronal function correlate with motor impairments in Rhesus monkeys. *J Comp Neurol* 1998; 401: 253-265.
- Endo T, Kobayashi M, Kobayashi S, Onaya T. Immunocytochemical and biochemical localization of parvalbumin in the retina. *Cell Tissue Res* 1986; 243: 213-217.
- Erhardt NM, Sherwood NM. PACAP maintains cell cycling and inhibits apoptosis in chick neuroblasts. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 221: 121-134.
- Eriksson P, Ankarberg E, Viberg H, Fredriksson A. The developing cholinergic system as target for environmental toxicants, nicotine and polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for neurotoxicological processes in mice. *Neurotox Res* 2001; 3: 37-51.
- Ertl T. Neonatal care in premature infants. *Orv Hetil* 1999; 140: 1611-1618. Review.
- Evans JJ. Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. *Endocr Rev* 1999; 20: 46-67.
- Fahrenkrug J, Hannibal J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide immunoreactivity in capsaicin-sensitive nerve fibres supplying the rat urinary tract. *Neuroscience* 1998; 83: 1261-1272.
- Falluel-Morel A, Aubert N, Vaudry D, Basille M, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinase-dependent mechanism in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 2004; 91: 1231-1243.
- Falluel-Morel A, Vaudry D, Aubert N, Galas L, Benard M, Basille M, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents the effects of ceramides on migration, neurite outgrowth, and cytoskeleton remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2637-2642.
- Falluel-Morel A, Chafai M, Vaudry D, Basille M, Cazillis M, Aubert N, Louiset E, de Jouffrey S, Le Bigot JF, Fournier A, Gressens P, Rostène W, Vaudry H, Gonzalez BJ. The neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide exerts anti-apoptotic and differentiating effects during neurogenesis: focus on cerebellar granule neurones and embryonic stem cells. *J Neuroendocrinol* 2007; 19: 321-327.
- Falus A. Az immunológia élettani és molekuláris alapjai. Semmelweis Kiadó, Budapest, 1998.
- Farini D, Puglianiello A, Mammi C, Siracusa G, Moretti C. Dual effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on prostate tumor LNCaP cells: short- and long-term exposure affect proliferation and neuroendocrine differentiation. *Endocrinology* 2003; 144: 1631-1643.
- Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 2007; 54: 162-180.
- Farnham MM, Li Q, Goodchild AK, Pilowsky PM. PACAP is expressed in sympathoexcitatory bulbospinal C1 neurons of the brain stem and increases sympathetic nerve activity in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294: R1304-1311.
- Favrais G, Couvineau A, Laburthe M, Gressens P, Lelievre V. Involvement of VIP and PACAP in neonatal brain lesions generated by a combined excitotoxic/inflammatory challenge. *Peptides* 2007; 28: 1727-1737.
- Figiel M, Engele J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *J Neurosci* 2000; 20: 3596-3605.
- Foda HD, Sharaf HH, Absood A, Said SI. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides* 1995; 16: 1057-1061.
- Frechilla D, Garcia-Osta A, Palacios S, Cenarruzabeitia E, Del Rio J. BDNF mediates the neuroprotective effect of PACAP38 on rat cortical neurons. *Neuroreport* 2001; 12: 919-923.

- Freson K, Hashimoto H, Thys C, Wittevrongel C, Danloy S, Morita Y, Shintani N, Tomiyama Y, Vermynen J, Hoylaerts MF, Baba A, Van Geet C. The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a physiological inhibitor of platelet activation. *J Clin Invest* 2004; 113: 905-912.
- Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 229-237.
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1995; 26: 627-635.
- Gábel R, Witkovsky P. Cholinergic, but not the rod-pathway-related glycinergic (AII), amacrine cells contain calretinin in the rat retina. *Neurosci Lett* 1998; 247: 179-182.
- Girard BM, Young BA, Buttolph TR, White SL, Parsons RL. Regulation of neuronal pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide expression during culture of guinea-pig cardiac ganglia. *Neuroscience* 2007; 146: 584-593.
- Girard BM, Wolf-Johnston A, Braas KM, Birder LA, May V, Vizzard MA. PACAP-mediated ATP release from rat urothelium and regulation of PACAP/VIP and receptor mRNA in micturition pathways after Cyclophosphamide (CYP)-induced cystitis. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 310-320.
- Gloddek J, Pagotto U, Paez Pereda M, Arzt E, Stalla GK. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *J Endocrinol* 1999; 160: 483-490.
- Gong J, Jellali A, Mutterer J, Sahel JA, Rendon A, Picaud S. Distribution of vesicular glutamate transporters in rat and human retina. *Brain Res* 2006; 1082: 73-85.
- Gonzalez BJ, Basille M, Vaudry D, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 1997; 78: 419-430.
- Gonzalez-Burgos I, Perez-Vega MI, Beas-Zarate C. Neonatal exposure to monosodium glutamate induces cell death and dendritic hypotrophy in rat prefrontocortical pyramidal neurons. *Neurosci Lett* 2001; 297: 69-72.
- Gordon MN, Schreier WA, Ou X, Holcomb LA, Morgan DG. Exaggerated astrocyte reactivity after nigrostriatal deafferentation in the aged rat. *J Comp Neurol* 1997; 388: 106-119.
- Gordon JM, Dusting GJ, Woodman OL, Ritchie RH. Cardioprotective action of CRF peptide urocortin against simulated ischemia in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H330-336.
- Gould TJ, Stromberg I, Bickford PC. Decline in striatal dopamine D1 and D2 receptor activation in aged F344 rats. *Neurobiol Aging* 1996; 17: 877-883.
- Gras S, Host E, Fahrenkrug J. Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the cyclic recruitment of immature follicles in the rat ovary. *Regul Pept* 2005; 128: 69-74.
- Grumolato L, Elkhoul AG, Ghzili H, Alexandre D, Coulouarn C, Yon L, Salier JP, Eiden LE, Fournier A, Vaudry H, Anouar Y. Microarray and suppression subtractive hybridization analyses of gene expression in pheochromocytoma cells reveal pleiotropic effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cell proliferation, survival, and adhesion. *Endocrinology* 2003; 144: 2368-2379.
- Guillot TS, Richardson JR, Wang MZ, Li YJ, Taylor TN, Ciliax BJ, Zachrisson O, Mercer A, Miller GW. PACAP38 increases vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) expression and attenuates methamphetamine toxicity. *Neuropeptides* 2008; 42: 423-434.
- Guirland C, Buck KB, Gibney JA, DiCicco-Bloom E, Zheng JQ. Direct cAMP signaling through G-protein-coupled receptors mediates growth cone attraction induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J Neurosci* 2003; 23: 2274-2283.
- Gutierrez-Canas I, Rodriguez-Henche N, Bolanos O, Carmena MJ, Prieto JC, Juarranz MG. VIP and PACAP are autocrine factors that protect the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 from apoptosis induced by serum withdrawal. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 1050-1058.
- Hamano K, Kiyama H, Emson PC, Manabe R, Nakauchi M, Tohyama M. Localization of two calcium binding proteins, calbindin (28 kD) and parvalbumin (12 kD), in the vertebrate retina. *J Comp Neurol* 1990; 302: 417-424.
- Han P, Lucero MT. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide reduces A-type K⁺ currents and caspase activity in cultured mouse olfactory neurons. *Neuroscience* 2005; 134: 745-756.
- Hannibal J. Roles of PACAP-containing retinal ganglion cells in circadian timing. *Int Rev Cytol* 2006; 251: 1-39.
- Hannibal J, Fahrenkrug J. Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res* 2004; 316: 99-113.
- Hansel DE, May V, Eipper BA, Ronnett GV. Pituitary adenylate cyclase activating peptides and α -amidation in olfactory neurogenesis and neuronal survival in vitro. *J Neurosci* 2001; 21: 4625-4636.

- Hardwick JC, Tompkins JD, Locknar SA, Merriam LA, Young BA, Parsons RL. Calcium influx through channels other than voltage-dependent calcium channels is critical to the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-induced increase in excitability in guinea pig cardiac neurons. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 317-321.
- Hartfield PJ, Bilney AJ, Murray AW. Neurotrophic factors prevent ceramide-induced apoptosis downstream of c-Jun N-terminal kinase activation in PC12 cells. *J Neurochem* 1998; 71: 161-169.
- Hashimoto H, Nogi H, Mori K, Ohishi H, Shigemoto R, Yamamoto K, Matsuda T, Mizuno N, Nagata S, Baba A. Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 1996; 371: 567-577.
- Hashimoto H, Hagihara N, Koga K, Yamamoto K, Shintani N, Tomimoto S, Mori W, Koyama Y, Matsuda T, Baba A. Synergistic induction of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene expression by nerve growth factor and PACAP in PC12 cells. *J Neurochem* 2000; 74: 501-507.
- Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13355-13360.
- Hashimoto H, Kunugi A, Arakawa N, Shintani N, Fujita T, Kasai A, Kawaguchi C, Morita Y, Hirose M, Sakai Y, Baba A. Possible involvement of a cyclic AMP-dependent mechanism in PACAP-induced proliferation and ERK activation in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 337-343.
- Hautmann M, Friis UG, Desch M, Todorov V, Castrop H, Segerer F, Otto C, Schütz G, Schweda F. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates renin secretion via activation of PAC1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1150-1156.
- Hayez N, Harfi I, Lema-Kisoka R, Svoboda M, Corazza F, Sariban E. The neuropeptides vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) modulate several biochemical pathways in human leukemic myeloid cells. *J Neuroimmunol* 2004; 149: 167-181.
- Hebert MA, Gerhardt GA. Normal and drug-induced locomotor behavior in aging: comparison to evoked DA release and tissue content in Fischer 344 rats. *Brain Res* 1998; 797: 42-54.
- Heinzelmann A, Kirilly E, Meltzer K, Szabó E, Baba A, Hashimoto H, Köves K. PACAP is transiently expressed in anterior pituitary gland of rats: in situ hybridization and cell immunoblot assay studies. *Peptides* 2008; 29: 571-577.
- Henle F, Fischer C, Meyer DK, Leemhuis J. Vasoactive intestinal peptide and PACAP38 control N-methyl-D-aspartic acid-induced dendrite motility by modifying the activities of Rho GTPases and phosphatidylinositol 3-kinases. *J Biol Chem* 2006; 281: 24955-24969.
- Héraud C, Hilairiet S, Muller JM, Leterrier JF, Chadéneau C. Neuritogenesis induced by vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, and peptide histidine methionine in SH-SY5y cells is associated with regulated expression of cytoskeleton mRNAs and proteins. *J Neurosci Res* 2004; 75: 320-329.
- Heyser CJ, Pellitier M, Ferris JS. The effects of methylphenidate on novel object exploration in weanling and periadolescent rats. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1021: 465-469.
- Hill JM, Gozes I, Hill JL, Fridkin M, Brenneman DE. Vasoactive intestinal peptide antagonist retards the development of neonatal behaviors in the rat. *Peptides* 1991; 12: 187-192.
- Hirose M, Leatmanorath Z, Laurita KR, Carlson MD. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on canine atrial electrophysiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H1667-1674.
- Hocking PM, Channing CE, Waddington D, Jones RB. Age-related changes in fear, sociality and pecking behaviours in two strains of laying hen. *Br Poult Sci* 2001; 42: 414-423.
- Ishido M, Masuo Y. Transcriptome of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-differentiated PC12 cells. *Regul Pept* 2004; 123: 15-21.
- Ishimoto I, Kiyama H, Hamano K, Shiosaka S, Malbon CC, Nakauchi M, Emson PC, Manabe R, Tohyama M. Co-localization of adrenergic receptors and vitamin-D-dependent calcium-binding protein (calbindin) in the dopaminergic amacrine cells of the rat retina. *Neurosci Res* 1989; 3: 257-263.
- Isobe K, Tatsuno I, Yashiro T, Nanmoku T, Takekoshi K, Kawakami Y, Nakai T. Expression of mRNA for PACAP and its receptors in intra- and extra-adrenal human pheochromocytomas and their relationship to catecholamine synthesis. *Regul Pept* 2003; 110: 213-217.
- Ito Y, Arakawa M, Ishige K, Fukuda H. Comparative study of survival signal withdrawal- and 4-hydroxynonenal-induced cell death in cerebellar granule cells. *Neurosci Res* 1999; 35: 321-327.
- Itoh K, Weis S, Mehraein P, Müller-Höcker J. Cytochrome c oxidase defects of the human substantia nigra in normal aging. *Neurobiol Aging* 1996; 17: 843-848.
- Jamen F, Bouschet T, Laden JC, Bockaert J, Brabet P. Up-regulation of the PACAP type-1 receptor (PAC1) promoter by neurotrophins in rat PC12 cells and mouse cerebellar granule cells via the Ras/mitogen-activated protein kinase cascade. *J Neurochem* 2002; 82: 1199-1207.

- Jansen-Olesen I, Goadsby PJ, Uddman R, Edvinsson L. Vasoactive intestinal peptide (VIP) like peptides in the cerebral circulation of the cat. *J Auton Nerv Syst* 1994; 49: S97-103.
- Jansen-Olesen I, Gulbenkian S, Engel U, Cunha e Sá M, Edvinsson L. Peptidergic and non-peptidergic innervation and vasomotor responses of human lenticulostriate and posterior cerebral arteries. *Peptides* 2004; 25: 2105-2114.
- Johnson J, Tian N, Caywood MS, Reimer RJ, Edwards RH, Copenhagen DR. Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina: GABA and glycine precede glutamate. *J Neurosci* 2003; 23: 518-529.
- Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH, Cha CI. Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol* 2004; 476: 388-413.
- Kametani H, Iijima S, Spangler EL, Ingram DK, Joseph JA. In vivo assessment of striatal dopamine release in the aged male Fischer 344 rat. *Neurobiol Aging* 1995; 16: 639-646.
- Katona F. Az öntudat újraébredése. A humán idegrendszer ontogenesise. Medicina Könyvkiadó RT, Budapest, 2001.
- Kausz M, Arimura A, Köves K. Distribution and somatotopical localization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the trigeminal ganglion of cats and rats. *Ann NY Acad Sci* 1998; 865: 529-532.
- Kausz M, Murai Z, Arimura A, Köves K. Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) immunoreactive elements in the brain stem of rats studied by immunohistochemistry. *Neurobiology (Bp)* 1999; 7: 19-31.
- Kántor O, Molnár J, Arimura A, Köves K. PACAP38 and PACAP27 administered intracerebroventricularly have an opposite effect on LH secretion. *Peptides* 2000; 21: 817-820.
- Kántor O, Heinzlmann A, Suzuki N, Vincze E, Kocsis K, Köves K. Distribution of PACAP and its mRNA in several nonneural tissues of rats demonstrated by sandwich enzyme immunoassay and RT-PCR technique. *Regul Pept* 2002; 109: 103-105.
- Kienlen Campard P, Crochemore C, Rene F, Monnier D, Koch B, Loeffler JP. PACAP type I receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *DNA Cell Biol* 1997; 16: 323-333.
- Kim WK, Kan Y, Ganea D, Hart RP, Gozes I, Jonakait GM. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor- α production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *J Neurosci* 2000; 20: 3622-3630.
- Kis B, Mezei Z, Dancsó G, Pataricza J, Gecse A, Papp JG, Telegdy G. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on the cyclooxygenase pathway of rat platelets and on platelet aggregation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1999; 58: 103-112.
- Klingberg H, Brankack J, Klingberg F. Long-term effects on behavior after postnatal treatment with monosodium-L-glutamate. *Biomed Biochim Acta* 1987; 46: 705-711.
- Komi N, Okawa K, Tateishi Y, Shirakawa M, Fujiwara T, Akutsu H. Structural analysis of pituitary adenylate cyclase activating polypeptides bound to phospholipids by magic angle spinning solid-state NMR. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 3001-3011.
- Kong LY, Maderdrut JL, Jeohn GH, Hong JS. Reduction of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mixed cortical neuron/glia cultures by femtomolar concentrations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Neuroscience* 1999; 91: 493-500.
- Kopper L, Fésüs L. Apoptózis. Medicina Könyvkiadó RT, Budapest, 2002.
- Kozicz T, Arimura A. Synaptic interaction between galanin immunoreactive neurons and axon terminals immunopositive for VIP and PACAP in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Ann NY Acad Sci* 2000; 921: 327-332.
- Kozicz T, Arimura A. Dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein-immunoreactive neurons activated by acute stress are innervated by fiber terminals immunopositive for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the extended amygdala in the rat. *Regul Pept* 2002; 109: 63-70.
- Kozicz T, Vigh S, Arimura A. Axon terminals containing PACAP- and VIP-immunoreactivity form synapses with CRF-immunoreactive neurons in the dorsolateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Brain Res* 1997; 767: 109-119.
- Kozicz T, Vigh S, Arimura A. Immunohistochemical evidence for PACAP and VIP interaction with met-enkephalin and CRF containing neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. *Ann NY Acad Sci* 1998a; 865: 523-528.
- Kozicz T, Vigh S, Arimura A. The source of origin of PACAP- and VIP-immunoreactive fibers in the laterodorsal division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Brain Res* 1998b; 810: 211-219.
- Köves K, Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Vigh S, Miller J. Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 1990; 127: 264-271.

- Köves K, Arimura A, Görös TG, Somogyvári-Vigh A. Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 1991; 54: 159-169.
- Köves K, Arimura A, Vigh S, Somogyvári-Vigh A, Miller J. Immunohistochemical localization of PACAP in the ovine digestive system. *Peptides* 1993; 14: 449-455.
- Köves K, Kántor O, Scammel JG, Arimura A. PACAP colocalizes with luteinizing and follicle-stimulating hormone immunoreactivities in the anterior lobe of the pituitary gland. *Peptides* 1998a; 19: 1069-1072.
- Köves K, Molnár J, Kántor O, Lakatos A, Főgel K, Kausz M, Vandermeers-Piret MC, Somogyvári-Vigh A, Arimura A. Role of PACAP in the regulation of gonadotroph hormone secretion during ontogenesis: a single neonatal injection of PACAP delays puberty and its intracerebroventricular administration before the critical period of proestrous stage blocks ovulation in adulthood. *Ann NY Acad Sci* 1998b; 865: 590-594.
- Köves K, Kántor O, Vereczki V, Kausz M, Nemeskéri A, Főgel K, Kiss A, Görös TJ, Szeiffert G, Arimura A. PACAP and VIP in the photoneuroendocrine system. From the retina to the pituitary gland. *Ann NY Acad Sci* 2000; 921: 321-326.
- Köves K, Vereczki V, Molnár J, Kántor O, Heinzlmann A, Szabó E. Presence and role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the photoneuroendocrine system. In: Csernus V, Mess B (eds): *Rhythmic biological processes*. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 2003. pp: 147-164.
- Krishnadas A, Onyuksek H, Rubinstein I. Interactions of VIP, secretin and PACAP1-38 with phospholipids: a biological paradigm revisited. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 1005-1012.
- Kubo T, Kohira R, Okano T, Ishikawa K. Neonatal glutamate can destroy the hippocampal CA1 structure and impair discrimination learning in rats. *Brain Res* 1993; 616: 311-314.
- Laburthe M, Couvineau A, Tan V. Class II G protein/coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 2007; 28: 1631-1639.
- Langoth N, Kalbe J, Bernkop-Schnürch A. Development of a mucoadhesive and permeation enhancing buccal delivery system for PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide). *Int J Pharm* 2005; 296: 103-111.
- Langoth N, Kahlbacher H, Schöffmann G, Schmerold I, Schuh M, Franz S, Kurka P, Bernkop-Schnürch A. Thiolated chitosans: design and in vivo evaluation of a mucoadhesive buccal peptide drug delivery system. *Pharm Res* 2006; 23: 573-579.
- Larsen JO, Hannibal J, Knudsen SM, Fahrenkrug J. Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat after transection of the masseteric nerve. *Mol Brain Res* 1997; 46: 109-117.
- Lázár Z, Shahbazian A, Benkó R, Tóth G, Penke B, Barthó L, Holzer P. PACAP-(6-38) inhibits the effects of vasoactive intestinal polypeptide, but not PACAP, on the small intestinal circular muscle. *Eur J Pharmacol* 2001; 431: 259-264.
- Lazarovici P, Jiang H, Fink D. The 38-amino-acid form of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide induces neurite outgrowth in PC12 cells that is dependent on protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase but not on protein kinase A, nerve growth factor receptor tyrosine kinase, p21ras G protein, and pp60c-src cytoplasmic tyrosine kinase. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 547-558.
- Le SV, Yamaguchi DJ, McArdle CA, Tachiki K, Pisegna JR, Germano P. PAC1 and PACAP expression, signaling, and effect on the growth of HCT8, human colonic tumor cells. *Regul Pept* 2002; 109: 115-125.
- Lebon A, Seyer D, Cosette P, Coquet L, Jouenne T, Chan P, Leprince J, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ, Vaudry D. Identification of proteins regulated by PACAP in PC12 cells by 2D gel electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 380-387.
- Lee H, Suk K. Selective modulation of microglial signal transduction by PACAP. *Neuroreport* 2004; 15: 1469-1474.
- Lee FS, Rajagopal R, Kim AH, Chang PC, Chao MV. Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase activating polypeptides. *J Biol Chem* 2002; 277: 9096-9102.
- Lee J, Park HJ, Choi HS, Kwon HB, Arimura A, Lee BJ, Choi WS, Chun SY. Gonadotropin stimulation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) messenger ribonucleic acid in the rat ovary and the role of PACAP as a follicle survival factor. *Endocrinology* 1999; 140: 818-826.
- Lee M, Lelievre V, Zhao P, Torres M, Rodriguez W, Byun JY, Doshi S, Ioffe Y, Gupta G, de los Monteros AE, de Vellis J, Waschek J. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates DNA synthesis but delays maturation of oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* 2001; 21: 3849-3859.
- Légrádi G, Shioda S, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in autonomic regulatory areas of the rat medulla oblongata. *Neurosci Lett* 1994; 176: 193-196.
- Légrádi G, Hannibal J, Lechan RM. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-nerve terminals densely innervate corticotropin-releasing hormone-neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 1998; 246: 145-148.

- Légrádi G, Das M, Giunta B, Hirani K, Mitchell EA, Diamond DM. Microinfusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide into the central nucleus of amygdala of the rat produces a shift from an active to passive mode of coping in the shock-probe fear/defensive burying test. *Neural Plast* 2007; 2007: 79102.
- Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma - different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Rev* 2002; 39: 55-73.
- Lelievre V, Hu Z, Byun JY, Ioffe Y, Waschek JA. Fibroblast growth factor-2 converts PACAP growth action on embryonic hindbrain precursors from stimulation to inhibition. *J Neurosci Res* 2002; 67: 566-573.
- Lelievre V, Ghiani CA, Seksenyan A, Gressens P, de Vellis J, Waschek JA. Growth factor-dependent actions of PACAP on oligodendrocyte progenitor proliferation. *Regul Pept* 2006; 137: 58-66.
- Lénárd L, Karádi Z, Szabó I, Hahn Z. Pallidal mechanisms in the organizations of feeding and sensorimotor integration. In: Lissak K, editor. Recent development of neurobiology in Hungary. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982.
- Lénárd L Jr, Lázár Z, Benkő R, Szigeti R, Báthori Z, Tóth GK, Penke B, Barthó L. Inhibitory effect of PACAP(6-38) on relaxations induced by PACAP, VIP and non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation in the guinea-pig taenia caeci. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 361: 492-497.
- Lenti L, Domoki F, Kis D, Hegyi O, Toth GK, Busija DW, Bari F. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces pial arteriolar vasodilation through cyclooxygenase-dependent and independent mechanisms in newborn pigs. *Brain Res* 2007; 1165: 81-88.
- Li M, Funahashi H, Mbikay M, Shioda S, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-mediated intracrine signaling in the testicular germ cells. *Endocrine* 2004; 23: 59-75.
- Li M, David C, Kikuta T, Somogyvari-Vigh A, Arimura A. Signaling cascades involved in neuroprotection by subpicomolar pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38. *J Mol Neurosci* 2005; 27: 91-105.
- Li M, Cortez S, Nakamachi T, Batuman V, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is a potent inhibitor of the growth of light chain secreting human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2006; 66: 8796-8803.
- Li M, Maderdrut JL, Lertora JJ, Batuman V. Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple myeloma and myeloma kidney: a case study. *Peptides* 2007; 28: 1891-1895.
- Li M, Maderdrut JL, Lertora JJ, Arimura A, Batuman V. Renoprotection by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in multiple myeloma and other kidney diseases. *Regul Pept* 2008; 145: 24-32.
- Lindner MD, Cain CK, Plone MA, Frydel BR, Blaney TJ, Emerich DF, Hoane MR. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. *Behav Brain Res* 1999; 102: 1-16.
- Lioudyno M, Skoglosa Y, Takei N, Lindholm D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) protects dorsal root ganglion neurons from death and induces calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in vitro. *J Neurosci Res* 1998; 51: 243-256.
- Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79: 1431-1568.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84-91.
- Lu N, DiCicco-Bloom E. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3357-3362.
- Mácsai M, Pataki I, Tóth G, Szabó G. The effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on acute and chronic morphine actions in mice. *Regul Pept* 2002; 109: 57-62.
- Marosi M, Rákos G, Robotka H, Németh H, Sas K, Kis Z, Farkas T, Lür G, Vécsei L, Toldi J. Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischemia. *J Neurosci Methods* 2006; 156: 231-235.
- Marshall JF, Rosenstein AJ. Age-related decline in rat striatal dopamine metabolism is regionally homogeneous. *Neurobiol Aging* 1990; 11: 131-137.
- Marshall JF, Turner BH, Tetelbaum PH. Sensory neglect produced by lateral hypothalamic damage. *Science* 1971; 174: 523-525.
- Marshall JF, Drew MC, Neve KA. Recovery of function after mesotelencephalic dopaminergic injury in senescence. *Brain Res* 1983; 259: 249-260.
- Masmoudi-Kouki O, Gandolfo P, Castel H, Leprince J, Fournier A, Dejda A, Vaudry H, Tonon MC. Role of PACAP and VIP in astroglial functions. *Peptides* 2007; 28: 1753-1760.
- Masuo Y, Noguchi J, Morita S, Matsumoto Y. Effects of intracerebroventricular administration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on the motor activity and reserpine-induced hypothermia in murines. *Brain Res* 1995; 700: 219-226.

- Matsuyama S, Matsumoto A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A. Impaired long-term potentiation in vivo in the dentate gyrus of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) or PACAP type I receptor-mutant mice. *Neuroreport* 2003; 14: 2095-2098.
- McIlvain HB, Baudy A, Sullivan K, Liu D, Pong K, Fennell M, Dunlop J. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) induces differentiation in the neuronal F11 cell line through a PKA-dependent pathway. *Brain Res* 2006; 1077: 16-23.
- Mei YA, Vaudry D, Basille M, Castel H, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I_k in the anti-apoptotic action of PACAP. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 1446-1458.
- Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Brain Res* 1992; 89: 67-78.
- Memezawa H, Zhao Q, Smith ML, Siesjo BK. Hyperthermia nullifies the ameliorating effect of dizocilpine maleate (MK-801) in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1995; 670: 48-52.
- Menzies SA, Hoff JT, Betz AL. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* 1992; 31: 100-107.
- Mercer A, Rönnholm H, Holmberg J, Lundh H, Heidrich J, Zachrisson O, Ossoinak A, Frisén J, Patrone C. PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J Neurosci Res* 2004; 76: 205-215.
- Merchenthaler I, Dellovade TL, Shughrue PJ. Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1007: 89-100. Review.
- Meyer DK. The effects of PACAP on neural cell proliferation. *Regul Pept* 2006; 137: 50-57.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 567-574.
- Miyata A, Jiang L, Dahl RR, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 643-648.
- Mizushima H, Banks WA, Dohi K, Shioda S, Matsumoto H, Matsumoto K. The effect of cardiac arrest on the permeability of the mouse blood-brain and blood-spinal cord barrier to pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Peptides* 1999; 20: 1337-1340.
- Mo JQ, Hom DG, Andersen JK. Decreases in protective enzymes correlates with increased oxidative damage in the aging mouse brain. *Mech Ageing Dev* 1995; 81: 73-82.
- Mokrey J. Experimental models and behavioral tests used in the study of Parkinson's disease. *Physiol Res* 1995; 44: 143-150.
- Moller K, Reimer M, Ekblad E, Hannibal J, Fahrenkrug J, Kanje M, Sundler F. The effects of axotomy and preganglionic denervation on the expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), galanin and PACAP type I receptors in the rat superior cervical ganglion. *Brain Res* 1997; 775: 166-182.
- Monaghan TK, Pou C, Mackenzie CJ, Plevin R, Lutz EM. Neurotrophic actions of PACAP-38 and LIF on human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 45-56.
- Moody TW, Leyton J, Casibang M, Pisegna J, Jensen RT. PACAP-27 tyrosine phosphorylates mitogen activated protein kinase and increases VEGF mRNAs in human lung cancer cells. *Regul Pept* 2002; 109: 135-140.
- Morio H, Tatsuno I, Hirai A, Tamura Y, Saito Y. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects rat-cultured cortical neurons from glutamate-induced cytotoxicity. *Brain Res* 1996; 741: 82-88.
- Morley JE, Horowitz M, Morley PM, Flood JF. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) reduces food intake in mice. *Peptides* 1992; 13: 1133-1135.
- Morrison R, Kinoshita Y, Johnson MD, Ghatan S, Ho JT, Garden G. Neuronal survival and cell death signaling pathways. *Adv Exp Med Biol* 2002; 513: 41-86.
- Moser A, Scholz J, Gänslé A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-27) enhances tyrosine hydroxylase activity in the nucleus accumbens of the rat. *Neuropeptides* 1999; 33: 492-497.
- Murck H, Steiger A, Frieboes RM, Antonijevic IA. Pituitary adenylate cyclase activating peptide affects homeostatic sleep regulation in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E853-857.
- Murray HE, Pillai AV, McArthur SR, Razvi N, Datla KP, Dexter DT, Gillies GE. Dose- and sex-dependent effects of the neurotoxin 6-hydroxydopamine on the nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats: differential actions of estrogen in males and females. *Neuroscience* 2003; 116: 213-222.

- Mustafa T, Eiden LE. Secretin superfamily: PACAP, VIP, and Related Peptides. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Ed: Lajtha A. Springer. 2008; pp: 463-500.
- Nagy AD, Csernus VJ. The role of PACAP in the control of circadian expression of clock genes in the chicken pineal gland. *Peptides*. 2007; 28: 1767-1774.
- Nagy Z. *Stroke kézikönyv*. Springer, Budapest, 1999.
- Nagy Z. *Vascularis Neurologia*. B+V Kiadó, Budapest, 2006.
- Nemetz N, Abad C, Lawson G, Nobuta H, Chhith S, Duong L, Tse G, Braun J, Waschek JA. Induction of colitis and rapid development of colorectal tumors in mice deficient in the neuropeptide PACAP. *Int J Cancer* 2008; 122: 1803-1809.
- Nicot A, DiCicco-Bloom E. Regulation of neuroblast mitosis is determined by PACAP receptor isoform expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4758-4763.
- Nicot A, Lelièvre V, Tam J, Waschek JA, DiCicco-Bloom E. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and sonic hedgehog interact to control cerebellar granule precursor cell proliferation. *J Neurosci* 2002; 22: 9244-9254.
- Nicot A, Otto T, Brabet P, DiCicco-Bloom EM. Altered social behavior in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *J Neurosci* 2004; 24: 8786-8795.
- Nielsen KM, Chaverra M, Hapner SJ, Nelson BR, Todd V, Zigmond RE, Lefcort F. PACAP promotes sensory neuron differentiation: blockade by neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci* 2004; 25: 629-641.
- Nilsson SF. PACAP-27 and PACAP-38: vascular effects in the eye and some other tissues in the rabbit. *Eur J Pharmacol* 1994; 253: 17-25.
- Nonaka N, Banks WA, Shioda S. Effects of aging, amyloid β protein, and lipopolysaccharide on the transport of PACAP across the blood-brain barrier. *Regul Pept* 2003; 115: 52.
- Norrholm SD, Das M, Légrádi G. Behavioral effects of local microinfusion of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) into the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Regul Pept* 2005; 128: 33-41.
- Nowak JZ, Jozwiak-Bebenista M, Bednarek K. Effects of PACAP and VIP on cyclic AMP formation in rat neuronal and astrocyte cultures under normoxic and hypoxic condition. *Peptides* 2007; 28: 1706-1712.
- Oh DS, Lieu SN, Yamaguchi DJ, Tachiki K, Lambrecht N, Ohning GV, Sachs G, Germano PM, Pisegna JR. PACAP regulation of secretion and proliferation of pure populations of gastric ECL cells. *J Mol Neurosci* 2005; 26: 85-98.
- Ohno F, Watanabe J, Sekihara H, Hirabayashi T, Arata S, Kikuyama S, Shioda S, Nakaya K, Nakajo S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. *Regul Pept* 2005; 126: 115-122.
- Ohta S, Gregg C, Weiss S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates forebrain neural stem cells and neurogenesis in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* 2006; 84: 1177-1186.
- Ohtaki H, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Kudo Y, Endo S, Aruga T, Goto N, Watanabe J, Kikuyama S, Shioda S. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 (PACAP38) on tissue oxygen content--treatment in central nervous system of mice. *Regul Pept* 2004; 123: 61-67.
- Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 7488-7493.
- Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S. Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 16-25.
- Ohtsuka M, Fukumitsu H, Furukawa S. PACAP decides neuronal laminar fate via PKA signaling in the developing cerebral cortex. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369: 1144-1149.
- Oka H, Jin L, Kulig E, Scheithauer BW, Lloyd RV. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibits transforming growth factor- β 1-induced apoptosis in a human pituitary adenoma cell line. *Am J Pathol* 1999; 155: 1893-1900.
- Okada R, Yamamoto K, Ito YM, Mochida H, Tonon MC, Fournier A, Leprince J, Vaudry H, Kikuyama S. VIP and PACAP stimulate TSH release from the bullfrog pituitary. *Peptides* 2007; 28: 1784-1789.
- Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; 164: 719-721.
- Onoue S, Endo K, Yajima T, Kashimoto K. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide attenuate glutamate-induced nNOS activation and cytotoxicity. *Regul Pept* 2002a; 107: 43-47.
- Onoue S, Endo K, Ohshima K, Yamija T, Kashimoto K. The neuropeptide PACAP attenuates β -amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides* 2002b; 23: 1471-1478.

- Onoue S, Ohshima K, Endo K, Yajima T, Kashimoto K. PACAP protects neuronal PC12 cells from the cytotoxicity of human prion protein fragment 106-126. *FEBS Lett* 2002c; 522: 65-70.
- Onoue S, Hanato J, Yamada S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide attenuates streptozotocin-induced apoptotic death of RIN-m5F cells through regulation of Bcl-2 family protein mRNA expression. *FEBS J* 2008; 275: 5542-5551.
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 2004; 23: 91-147.
- Otto C, Kovalchuk Y, Wolfer DP, Gass P, Martin M, Zuschratter W, Grone HJ, Kellendonk C, Tronche F, Maldonado R, Lipp HP, Konnerth A, Schutz G. Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *J Neurosci* 2001; 21: 5520-5527.
- Palkovits M, Somogyvári-Vigh A, Arimura A. Concentrations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human brain nuclei. *Brain Res* 1995; 699: 116-120.
- Palomo T, Beninger RJ, Kostrzewa RM, Archer T. Brain sites of movement disorder: genetic and environmental agents in neurodevelopmental perturbations. *Neurotox Res* 2003; 5: 1-26.
- Parsons RL, Rossignol TM, Calupca MA, Hardwick JC, Brass KM. PACAP peptides modulate guinea pig cardiac neuron membrane excitability and neuropeptide expression. *Ann NY Acad Sci* 2000; 921: 202-210.
- Pataki I, Adamik A, Jászberényi M, Mácsai M, Telegdy G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces hyperthermia in the rat. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1303-1308.
- Pataki I, Adamik A, Glover V, Toth G, Telegdy Gy. The effects of isatin (indole-2, 3-dione) on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced hyperthermia in rats. *BMC Neurosci* 2002; 3: 2.
- Pataki I, Adamik A, Jászberényi M, Mácsai M, Telegdy G. Involvement of transmitters in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced hyperthermia. *Regul Pept* 2003; 115: 187-193.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 1982.
- Perez V, Bouschet T, Fernandez C, Bockaert J, Journot L. Dynamic reorganization of the astrocyte actin cytoskeleton elicited by cAMP and PACAP: a role for phosphatidylinositol 3-kinase inhibition. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 26-32.
- Pesini P, Rois JL, Menendez L, Vidal S. The neonatal treatment of rats with monosodium glutamate induces morphological changes in the subfornical organ. *Acta Histo Embryol* 2004; 33: 273-277.
- Petullo D, Masonic K, Lincoln C, Wibberley L, Teliska M, Yao DL. Model development and behavioral assessment of focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci* 1999; 64: 1099-1108.
- Pirger Zs, Rácz B, Kiss T. Dopamine-induced programmed cell death is associated with cytochrome c release and caspase-3 activation in snail salivary gland cells. *Biol Cell* 2009; 101: 105-116.
- Przywara DA, Kulkarni JS, Wakade TD, Leontiev DV, Wakade AR. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and nerve growth factor use the proteosome to rescue nerve growth factor-deprived sympathetic neurons cultured from chick embryos. *J Neurochem* 1998; 71: 1889-1897.
- Pugh PC, Margiotta JF. Nicotinic acetylcholine receptor agonists promote survival and reduce apoptosis in chick ciliary ganglion neurons. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 15: 113-122.
- Ravni A, Bourgault S, Lebon A, Chan P, Galas L, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez B, Eiden LE, Vaudry D. The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *J Neurochem* 2006; 98: 321-329.
- Ravni A, Vaudry D, Gerdin MJ, Eiden MV, Falluel-Morel A, Gonzalez BJ, Vaudry H, Eiden LE. A cAMP-dependent, protein kinase A-independent signaling pathway mediating neuritogenesis through Egr1 in PC12 cells. *Mol Pharmacol* 2008; 73: 1688-1708.
- Rawlings SR, Hezareh M. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endocr Rev* 1996; 17: 4-29.
- Rábl K, Bánvölgyi T, Gábel R. Electrophysiological evidence for push-pull interactions in the inner retina of turtle. *Acta Biol Hung* 2002; 53: 141-151.
- Reichenstein M, Rehavi M, Pinhasov A. Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the mechanism of antidepressant action. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 330-338.
- Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuña-Castroviejo D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Ann NY Acad Sci* 1998; 854: 410-424.
- Reubi JC. In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications. *Ann NY Acad Sci* 2000; 921: 1-25.
- Rékási Z, Czömpöly T. Accumulation of rat pineal serotonin N-acetyltransferase mRNA induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in vitro. *J Mol Endocrinol* 2002; 28: 19-31.

- Rékási Z, Varga JL, Schally AV, Plonowski A, Halmos G, Csernus B, Armatis P, Groot K. Antiproliferative actions of growth hormone-releasing hormone antagonists on MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells involve cAMP independent pathways. *Peptides* 2001; 22: 879-886.
- Riera M, Torras J, Cruzado JM, Lloberas N, Liron J, Herrero I, Navarro MA, Grinyo JM. The enhancement of endogenous cAMP with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat kidney against ischemia through the modulation of inflammatory response. *Transplantation* 2001; 72: 1217-1223.
- Rius RA, Guidotti A, Costa E. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) potently enhances tyrosine hydroxylase (TH) expression in adrenal chromaffin cells. *Life Sci* 1994; 54: 1735-1743.
- Roberto M, Brunelli M. PACAP-38 enhances excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal CA1 region. *Learn Mem* 2000; 7: 303-311.
- Roberts RC, Ahn A, Swartz KJ, Beal MF, DiFiglia M. Intrastriatal injections of quinolinic acid or kainic acid: differential patterns of cell survival and the effects of analysis on outcome. *Exp Neurol* 1993; 124: 274-282.
- Röhlich P. Szövetan. Semmelweis Egyetem, Budapest, 2002; 396. oldal.
- Röhlich P. Szövetan. Semmelweis Egyetem, Budapest, 2002; 439. oldal.
- Said SI, Dickman K, Dey RD, Bandyopadhyay A, Stefanis PD, Raza S, Pakbaz S, Berisha HI. Glutamate toxicity in the lung and neuronal cells: prevention or attenuation by VIP and PACAP. *Ann NY Acad Sci* 1998; 865: 226-237.
- Sakai Y, Hashimoto H, Shintani N, Katoh H, Negishi M, Kawaguchi C, Kasai A, Baba A. PACAP activates Rac1 and synergizes with NGF to activate ERK1/2, thereby inducing neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 123: 18-26.
- Sanberg PR, Calderon SF, Giordano M, Tew JM, Norman AB. The quinolinic acid model of Huntington's disease: locomotor abnormalities. *Exp Neurol* 1989; 105: 45-53.
- Sanchez A, Chiriva-Internati M, Grammas P. Transduction of PACAP38 protects primary cortical neurons from neurotoxic injury. *Neurosci Lett* 2008; 448: 52-55.
- Sanchez A, Rao HV, Grammas P. PACAP38 protects rat cortical neurons against the neurotoxicity evoked by sodium nitroprusside and thrombin. *Regul Pept* 2009; 152: 33-40.
- Sandgren K, Lin Z, Ekblad E. Differential effects of VIP and PACAP on survival of cultured adult rat myenteric neurons. *Regul Pept* 2003; 111: 211-217.
- Sanes DH, Harris WA, Reh TA. Development of the Nervous System. Elsevier Academic Press, 2006.
- Sano H, Miyata A, Horio T, Nishikimi T, Matsuo H, Kangawa K. The effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cultured rat cardiocytes as a cardioprotective factor. *Regul Pept* 2002; 109: 107-113.
- Schwartz RW, Huston JP. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research: analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 1996a; 50: 275-331.
- Schwartz RW, Huston JP. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog Neurobiol* 1996b; 49: 215-266.
- Seki T, Shioda S, Izumi S, Arimura A, Koide R. Electron microscopic observation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-containing neurons in the rat retina. *Peptides* 2000a; 21: 109-113.
- Seki T, Izumi S, Shioda S, Zhou CJ, Arimura A, Koide R. Gene expression for PACAP receptor mRNA in the rat retina by in situ hybridization and in situ RT-PCR. *Ann NY Acad Sci* 2000b; 921: 366-369.
- Seki T, Izumi S, Shioda S, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) protects ganglion cell death against cutting of optic nerve in the rat retina. *Regul Pept* 2003; 115: 55 (abstract).
- Seki T, Nakatani M, Taki C, Shinohara Y, Ozawa M, Nishimura S, Ito H, Shioda S. Neuroprotective effect of PACAP against kainic acid-induced neurotoxicity in rat retina. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 531-534.
- Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Shioda S. Suppression of ganglion cell death by PACAP following optic nerve transection in the rat. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 57-60.
- Seki Y, Suzuki Y, Baskaya MK, Kano T, Saito K, Takayasu M, Shibuya M, Sugita K. The effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cerebral arteries and vertebral artery blood flow in anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol* 1995; 275: 259-266.
- Seress L, Lázár G, Kosaras B, Robertson RT. Regional effect of monosodium-L-glutamate on the superficial layers of superior colliculus in rat. *Cell Tissue Res* 1984; 235: 453-457.
- Severs JC, Froland WA. Dimerization of a PACAP peptide analogue in DMSO via asparagine and aspartic acid residues. *J Pharm Sci* 2008; 97: 1246-1256.

- Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev* 2000; 21: 619-670.
- Sherwood NM, Adams BA, Isaac ER, Wu S, Fradinger EA. Knocked down and out: PACAP in development, reproduction and feeding. *Peptides* 2007; 28: 1680-1687.
- Shieh PC, Tsao CW, Li JS, Wu HT, Wen YJ, Kou DH, Cheng JT. Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the action of ginsenoside Rh2 against beta-amyloid-induced inhibition of rat brain astrocytes. *Neurosci Lett* 2008; 434: 1-5.
- Shin CM, Chung YH, Kim MJ, Cha CI. Spatial and temporal distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in gerbil global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2001; 309: 53-56.
- Shintani N, Mori W, Hashimoto H, Imai M, Tanaka K, Tomimoto S, Hirose M, Kawaguchi C, Baba A. Defects in reproductive functions in PACAP-deficient female mice. *Regul Pept* 2002; 109: 45-48.
- Shintani N, Tomimoto S, Hashimoto H, Kawaguchi C, Baba A. Functional roles of the neuropeptide PACAP in brain and pancreas. *Life Sci* 2003; 74: 337-343.
- Shintani N, Suetake S, Hashimoto H, Koga K, Kasai A, Kawaguchi C, Morita Y, Hirose M, Sakai Y, Tomimoto S, Matsuda T, Baba A. Neuroprotective action of endogenous PACAP in cultured rat cortical neurons. *Regul Pept* 2005; 126: 123-128.
- Shioda S, Légrádi G, Leung WC, Nakajo S, Nakaya K, Arimura A. Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its messenger ribonucleic acid in the rat testis by light and electron microscopic immunocytochemistry and in situ hybridization. *Endocrinology* 1994; 135: 818-825.
- Shioda S, Shuto Y, Somogyvari-Vigh A, Legradi G, Onda H, Coy DH, Nakajo S, Arimura A. Localization and gene expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat brain. *Neurosci Res* 1997; 28: 345-354.
- Shioda S, Ozawa H, Dohi K, Mizushima H, Matsumoto K, Nakajo S, Takaki A, Zhou CJ, Nakai Y, Arimura A. PACAP protects hippocampal neurons against apoptosis: involvement of JNK/SAPK signaling pathway. *Ann NY Acad Sci* 1998; 865: 111-117.
- Shioda S, Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Watanabe J, Nakajo S, Arata S, Kitamura S, Okuda H, Takenoya F, Kitamura Y. Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 550-560.
- Shioda S, Vaudry H, May V, Braas K, Reglodi D, Gozes I. In memory of our teacher, dr. Akira arimura. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 3-7.
- Shoge K, Mishima HK, Saitoh T, Ishihara K, Tamura Y, Shiomi H, Sasa M. Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res* 1999; 839: 66-73.
- Skoglosa Y, Lewen A, Takei N, Hillered L, Lindholm D. Regulation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor type I after traumatic brain injury: comparison with brain-derived neurotrophic factor and the induction of neuronal cell death. *Neuroscience* 1999; 90: 235-247.
- Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development on behavior in the rat. *Brain Res* 1971a; 28: 85-95.
- Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain VI. Relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Res* 1971b; 33: 303-314.
- Sortwell CE, Camargo MD, Pitzer MR, Gyawali S, Collier TJ. Diminished survival of mesencephalic dopamine neurons grafted into aged hosts occurs during the immediate postgrafting interval. *Exp Neurol* 2001; 169: 23-29.
- Squibb RE, Tilson HA, Meyer OA, Lamartiniere CA. Neonatal exposure to monosodium glutamate alters the neurobehavioral performance of adult rats. *Neurotoxicology* 1981; 2: 471-484.
- Sreedharan SP, Huang JX, Cheung MC, Goetzl EJ. Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2939-2943.
- Stansfield KH, Philpot RM, Kirstein CL. The animal model of sensation seeking: the adolescent rat. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1021: 453-458.
- Stein DG. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogens? *Trends Neurosci* 2001; 24: 386-391.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol* 2002; 115: 87-113.
- Stumm R, Kolodziej A, Prinz V, Endres M, Wu DF, Höllt V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage. *J Neurochem* 2007; 103: 1666-1681.

- Suarez V, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Ingorokva S, Grosheva M, Neiss WF, Angelov DN, Klimaschewski L. The axotomy-induced neuropeptides galanin and pituitary adenylate cyclase-activating peptide promote axonal sprouting of primary afferent and cranial motor neurones. *Eur J Neurosci* 2006; 24: 1555-1564.
- Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res* 1997; 37: 3483-3493.
- Sugama S, Yang L, Cho BP, DeGiorgio LA, Lorenzl S, Albers DS, Beal MF, Volpe BT, Joh TH. Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. *Brain Res* 2003; 964: 288-294.
- Suk K, Park JH, Lee WH. Neuropeptide PACAP inhibits hypoxic activation of brain microglia: a protective mechanism against microglial neurotoxicity in ischemia. *Brain Res* 2004; 1026: 151-156.
- Suzuki T, Bramlett HM, Dietrich D. The importance of gender on the beneficial effects of posttraumatic hypothermia. *Exp Neurol* 2003; 184: 1017-1026.
- Szabó E, Horváth J, Heinzlmann A, Arimura A, Köves K. Neonatal PACAP administration in rats delays puberty through the influence of the LHRH neuronal system. *Regul Pept* 2002; 109: 49-55.
- Szabó F, Nemeskéri A, Arimura A, Köves K. Effect of PACAP on LH release studied by cell immunoblot assay depends on the gender, on the time of day and in female rats on the day of the estrous cycle. *Regul Pept* 2004; 123: 139-145.
- Szabó G, Mácsai M, Schek E, Telegdy G. The effect of vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on tolerance to morphine and alcohol in mice. *Ann NY Acad Sci* 1998; 865: 566-569.
- Szeberényi J. Molekuláris sejtbiológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 1999.
- Szirmai I. Neurológia. Medicina Kiadó, Budapest, 2007.
- Tabuchi A, Funaji K, Nakatsubo J, Fukuchi M, Tsuchiya T, Tsuda M. Inactivation of aconitase during the apoptosis of mouse cerebellar granule neurons induced by a deprivation of membrane depolarization. *J Neurosci Res* 2003; 71: 504-515.
- Takáts A. Parkinson-kór és egyéb mozgászavarok. Melania Kiadó, Budapest, 2001.
- Takei N, Skoglösa Y, Lindholm D. Neurotrophic and neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 1998; 54: 698-706.
- Takei N, Torres E, Yuhara A, Jongasma H, Otto C, Korhonen L, Abiru Y, Skoglösa Y, Schütz G, Hatanaka H, Sofroniew MV, Lindholm D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide promotes the survival of basal forebrain cholinergic neurons in vitro and in vivo: comparison with effects of nerve growth factor. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 2273-2280.
- Tanaka J, Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Yanaihara N, Kato Y. Neuronal protection from apoptosis by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Regul Pept* 1997; 72: 1-8.
- Tárczy M, Takáts A. Parkinson-szindróma. Springer-Verlag, Budapest, 1994.
- Tatsuno I, Gottschall PE, Köves K, Arimura A. Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rat astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 1027-1033.
- Tatsuno I, Somogyvari-Vigh A, Mizuno K, Gottschall PE, Hidaka H, Arimura A. Neuropeptide regulation of interleukin-6 production from the pituitary stimulation by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology* 1991; 129: 1797-1804.
- Tatsuno I, Morio H, Tanaka T, Hirai A, Tamura Y, Saito Y, Arimura A. Astrocytes are one of the main target cells for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 1996; 805: 613-619.
- Telegdy G, Kokavszky K. The action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on passive avoidance learning. The role of neurotransmitters. *Brain Res* 2000; 874: 194-199.
- Ten VS, Bradley-Moore M, Gingrich JA, Stark RI, Pinsky DJ. Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Behav Brain Res* 2003; 145: 209-219.
- Tompkins JD, Parsons RL. Identification of intracellular signaling cascades mediating the PACAP-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 292-298.
- Tornøe K, Hannibal J, Georg B, Schmidt PT, Hilsted L, Fahrenkrug J, Holst JJ. PACAP 1-38 as neurotransmitter in the porcine antrum. *Regul Pept* 2001; 101: 109-121.
- Uchida D, Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Shioda S, Banks WA. Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Brain Res* 1996; 736: 280-286.
- Uddman R, Goadsby PJ, Jansen I, Edvinsson L. PACAP, a VIP-like peptide: immunohistochemical localization and effect upon cat pial arteries and cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13: 291-297.

- Vallejo I, Vallejo M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces astrocyte differentiation of precursor cells from developing cerebral cortex. *Mol Cell Neurosci* 2002; 21: 671-683.
- van der Staay FJ, Augstein KH, Horvath E. Sensorimotor impairments in Wistar Kyoto rats with cerebral infarction, induced by unilateral occlusion of the middle cerebral artery: recovery of function. *Brain Res* 1996; 715: 108-188.
- van Landeghem FK, Weiss T, Oehmichen M, von Deimling A. Cellular localization of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) following traumatic brain injury in humans. *Acta Neuropathol* 2007; 113: 683-693.
- van Rijn CM, Marani E, Rietveld WJ. The neurotoxic effect of monosodium glutamate (MSG) on the retinal ganglion cells of the albino rat. *Histol Histopathol* 1986; 1: 291-295.
- Vandermeers A, Vandenborre S, Hou X, de Neef P, Robberecht P, Vandermeers-Piret MC, Christophe J. Antagonistic properties are shifted back to agonistic properties by further N-terminal shortening of pituitary adenylate-cyclase-activating peptides in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. *Eur J Biochem* 1992; 208: 815-819.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Anouar Y, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates both c-fos gene expression and cell survival in rat cerebellar granule neurons through activation of the protein kinase A pathway. *Neuroscience* 1998; 84: 801-812.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Fournier A, Vaudry H. Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9415-9420.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 2000a; 52: 269-324.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H. The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cystein protease caspase-3/CPP32. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000b; 97: 13390-13395.
- Vaudry D, Chen Y, Ravni A, Hamelink C, Elkahoul AG, Eiden LE. Analysis of the PC12 cell transcriptome after differentiation with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *J Neurochem* 2002a; 83: 1272-1284.
- Vaudry D, Rousselle C, Basille M, Falluel-Morel A, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002b; 99: 6398-6403.
- Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rousselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ. PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur J Neurosci* 2002c; 15: 1451-1560.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 2003; 72: 303-316.
- Vaudry D, Hamelink C, Damadzic R, Eskay RL, Gonzalez B, Eiden LE. Endogenous PACAP acts as a stress response peptide to protect cerebellar neurons from ethanol or oxidative insult. *Peptides* 2005; 26: 2518-2524.
- Vaudry D, Ravni A, Wurtz O, Benard M, Botia B, Jolivel V, Fournier A, Gonzalez B, Vaudry H. Effects of PACAP in the local regulation of endocrine glands. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*. Ed: Kastin AJ, Academic Press, London, 2006; pp: 867-874.
- Vereczki V, Köves K, Csáki A, Grósz K, Hoffman GE, Fiskum G. Distribution of hypothalamic, hippocampal and other limbic peptidergic neuronal cell bodies giving rise to retinopetal fibers: anterograde and retrograde tracing and neuropeptide immunohistochemical studies. *Neuroscience* 2006; 140: 1089-1100.
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000; 243: 167-190. Review.
- Vidal-Sanz M, Lafuente M, Sobrado-Calvo P, Selles-Navarro I, Rodriguez E, Mayor-Torroglosa S, Villegas-Perez MP. Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotox Res* 2000; 2: 215-227.
- Vígh J, Bánvölgyi T, Wilhelm M. Amacrine cells of the anuran retina: morphology, chemical neuroanatomy, and physiology. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 373-383. Review.
- Vigh S, Arimura A, Köves K, Somogyvári-Vigh A, Sitton J, Fermin CD. Immunohistochemical localization of the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), in human and primate hypothalamus. *Peptides* 1991; 12: 313-318.
- Villalba M, Bockaert J, Journot L. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci* 1997; 17: 83-90.
- Vincze E, Köves K. A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerkezete, előfordulása és szerepe az élettani működésekben. *Orvosi Hetilap* 2001; 142: 491-496.
- Vincze E, Kántor O, Kiss A, Gonda G, Gombás P, Kiss J, Juhász M, Arimura A, Köves K. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is present in human and cat gastric glands. *Peptides* 1999; 20: 937-941.

Vincze E, Kántor O, Kausz M, Németh J, Arimura A, Gonda P, Köves K. Comparative study on the appearance of various bioactive peptides in foregut derivatives during the ontogenesis. *J Physiol Paris* 2001; 95: 99-103.

Vlotides G, Zitzmann K, Hengge S, Engelhardt D, Stalla GK, Auernhammer CJ. Expression of novel neurotrophin-1/B-cell stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3) in murine pituitary folliculostellate TtT/GF cells: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide-induced stimulation of NNT-1/BSF-3 is mediated by protein kinase A, protein kinase C, and extracellular-signal-regulated kinase1/2 pathways. *Endocrinology* 2004; 145: 716-727.

Wang G, Qi C, Fan GH, Zhou HY, Chen SD. PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. *FEBS Lett* 2005; 579: 4005-4011.

Wang G, Pan J, Tan YY, Sun XK, Zhang YF, Zhou HY, Ren RJ, Wang XJ, Chen SD. Neuroprotective effects of PACAP27 in mice model of Parkinson's disease involved in the modulation of K(ATP) subunits and D2 receptors in the striatum. *Neuropeptides* 2008; 42: 267-276.

Warner DS, Zhou JG, Ramani R, Todd MM. Reversible focal ischemia in the rat: effects of halothane, isoflurane and methohexital anesthesia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11: 794-802.

Waschek JA. Multiple actions of pituitary adenylate cyclase activating peptide in nervous system development and regeneration. *Dev Neurosci* 2002; 24: 14-23.

Waschek JA, Casillas RA, Nguyen TB, DiCicco-Bloom EM, Carpenter EM, Rodriguez WI. Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and receptor: potential role in patterning and neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9602-9607.

Wassle H, Grunert U, Rohrenbeck J. Immunocytochemical staining of AII-amacrine cells in the rat retina with antibodies against parvalbumin. *J Comp Neurol* 1993; 322: 407-421.

Watanabe J, Nakamachi T, Matsuno R, Hayashi D, Nakamura M, Kikuyama S, Nakajo S, Shioda S. Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. *Peptides* 2007; 28: 1713-1719.

Winzell MS, Ahren B. Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides* 2007; 28: 1805-1813.

Wolf N, Kriegstein K. Phenotypic development of neonatal rat chromaffin cells in response to adrenal growth factors and glucocorticoids: focus on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Neurosci Lett* 1995; 200: 207-210.

Wyneken J, Gofrey MH, Bels V. *Biology of Turtles*. CRC Press, 2008; pp: 327-328.

Xu F, Tse FW, Tse A. Stimulatory actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in rat carotid glomus cells. *Adv Exp Med Biol* 2008; 605: 69-74.

Xu K, Xu Y, Brown-Jermyn D, Chen JF, Ascherio A, Dluzen DE, Schwarzschild MA. Estrogen prevents neuroprotection by caffeine in the mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2006; 26: 535-541.

Yager J, Towfighi J, Vannucci RC. Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr Res* 1993; 34: 525-529.

Yamaguchi T, Suzuki M, Yamamoto M. YM796, a novel muscarinic agonist, improves the impairment of learning behavior in a rat model of chronic focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1995; 669: 107-114.

Yamamoto H, Schmidt-Kasner R, Hamasaki DI, Yamamoto H, Parel JM. Complex neurodegeneration in retina following moderate ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion in Wistar rats. *Exp Eye Res* 2006; 82: 767-779.

Yanaihara H, Vigh S, Kozicz T, Somogyvári-Vigh A, Arimura A. Immunohistochemical demonstration of the intracellular localization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity in the rat testis using the stamp preparation. *Regul Pept* 1998; 78: 83-88.

Yuhara A, Nishio C, Abiru Y, Hatanaka H, Takei N. PACAP has a neurotrophic effect on cultured basal forebrain cholinergic neurons from adult rats. *Dev Brain Res* 2001; 131: 41-45.

Yurek DM, Fletcher-Turner A. Differential expression of GDNF, BDNF, and NT-3 in the aging nigrostriatal system following a neurotoxic lesion. *Brain Res* 2001; 891: 228-235.

Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ, Schmid-Elsaesser R. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res* 2000; 863: 94-105.

Zeynalov E, Nemoto M, Hurn PD, Koehler RC, Bhardwaj A. Neuroprotective effect of kappa opioid receptor agonist is gender specific and linked to reduced neuronal nitric oxide. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 414-420.

Zhang Y, Danielsen N, Sundler F, Mulder H. Pituitary adenylate cyclase activating peptide is upregulated in sensory neurons by inflammation. *Neuroreport* 1998; 9: 2833-2836.

Zhang YZ, Hannibal J, Zhao Q, Moller K, Danielsen N, Fahrenkrug J, Sundler F. Pituitary adenylate cyclase activating peptide expression in the rat dorsal root ganglia: up-regulation after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 1996; 74: 1099-1110.

Zhokhov SS, Desfeux A, Aubert N, Falluel-Morel A, Fournier A, Laudenbach V, Vaudry H, Gonzalez BJ. Bax siRNA promotes survival of cultured and allografted granule cell precursors through blockade of caspase-3 cleavage. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1042-1053.

Zhou CJ, Yada T, Kohno D, Kikuyama S, Suzuki R, Mizushima H, Shioda S. PACAP activates PKA, PKC and Ca^{2+} signaling cascades in rat neuroepithelial cells. *Peptides* 2001; 22: 1111-1117.

Zhou X, Rodriguez WI, Casillas RA, Ma V, Tam J, Hu Z, Lelievre V, Chao A, Waschek JA. Axotomy-induced changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP receptor gene expression in the adult rat facial motor nucleus. *J Neurosci Res* 1999; 57: 953-961.

Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, Dragovic J, Shen X, Fenyk-Melody JE, Schmidt K, Bagchi A, Griffin PR, Thornberry NA, Sinha Roy R. The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides. *J Biol Chem* 2003; 278: 22418-22423.

Zia F, Fagarasan M, Bitar K, Coy DH, Pisegna JR, Wank SA, Moody TW. Pituitary adenylate cyclase activating peptide receptors regulate the growth of non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55: 4886-4891.

VII. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Somogyvári-Vigh A, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. Review. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2861-2889. (IF: 5,385)

Az eredmények 1. fejezetéhez felhasznált közlemények

2. Reglődi D, Tamás A, Lengvári I. Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Bull* 2003; 59: 459-466. (IF: 2,609)
3. Reglődi D, Tamás A, Somogyvári-Vigh A, Szántó Z, Kertes E, Lénárd L, Arimura A, Lengvári I. Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides* 2002; 23: 2227-2234. (IF: 2,635)
4. Tamás A, Reglődi D, Szántó Z, Borsiczky B, Németh J, Lengvári I. Comparative neuroprotective effects of preischemic PACAP and VIP administration in permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neuroendocrinol Lett* 2002; 23: 249-254. (IF: 1,278)

Az eredmények 2. fejezetéhez felhasznált közlemények

5. Reglődi D, Lubics A, Kiss P, Lengvári I, Gaszner B, Tóth G, Hegyi O, Tamás A. Effect of PACAP in 6-OHDA-induced injury of the substantia nigra in intact young and ovariectomized female rats. *Neuropeptides* 2006; 40: 265-274. (IF: 2,789)
6. Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of age, gender, and gonadectomy on neurochemistry and behavior in animal models of Parkinson's disease. *Endocrine* 2006; 29: 275-287. (IF: 1,805)
7. Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal lesion. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 570-574. (IF: 1,93)
8. Reglődi D, Tamás A, Lengvári I, Tóth G, Szalontay L, Lubics A. Comparative study on the effects of PACAP in young, aging, and castrated males in a rat model of Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 518-524. (IF: 1,93)
9. Tamás A, Lubics A, Szalontay L, Lengvári I, Reglődi D. Age- and gender differences in behavioral and morphological outcome after 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Behav Brain Res* 2005; 158: 221-229. (IF: 2,865)
10. Reglődi D, Tamás A, Somogyvári-Vigh A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in animal models of neurodegenerative disorders - implications for Huntington and Parkinson's diseases. *Lett Drug Des Disc* 2005; 2: 311-315.
11. Reglődi D, Tamás A, Lubics A, Szalontay L, Lengvári I. Morphological and functional effects of PACAP in a 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul Pept* 2004; 123: 85-94. (IF: 2,531)
12. Reglődi D, Lubics A, Tamás A, Szalontay L, Lengvári I. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2004; 151: 303-312. (IF: 2,992)

Az eredmények 3. fejezetéhez felhasznált közlemények

13. Atlasz T, Szabadfi K, Reglődi D, Kiss P, Tamás A, Tóth G, Molnár A, Szabó K, Gábel R. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP1-38) and its fragments on retinal degeneration induced by neonatal MSG treatment. *Ann NY Acad Sci* 2009; in press. (IF: 1,731)
14. Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, Babai N, Kőszegi Zs, Tamás A, Reglődi D, Gábel R. PACAP-mediated neuroprotection of neurochemically identified cell types in MSG-induced retinal degeneration. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 97-104. (IF: 1,735)
15. Atlasz T, Babai N, Kiss P, Reglődi D, Tamás A, Szabadfi K, Tóth G, Hegyi O, Lubics A, Gábel R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in bilateral carotid occlusion-induced retinal lesion in rats. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153: 108-114. (IF: 2,562)
16. Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglődi D, Tóth G, Kiss P, Gábel R. Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 149-155. (IF: 1,93)
17. Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglődi D, Kiss P, Gábel R. Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retina degeneration. *Neurotox Res* 2005; 8: 227-233. (IF: 1,664)
18. Tamás A, Gábel R, Rác B, Dénes V, Kiss P, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate. *Neurosci Lett* 2004; 372: 110-113. (IF: 2,019)

19. Rábl K, Reglődi D, Bánvölgyi T, Somogyvári-Vigh A, Lengvári I, Gábel R, Arimura A. PACAP inhibits anoxia-induced changes in physiological responses in horizontal cells in the turtle retina. *Regul Pept* 2002; 109: 71-74. (IF: 3,205)
20. Reglődi D, Somogyvári-Vigh A, Vigh J, Li M, Lengvári I, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is highly abundant in the nervous system of the anoxia-tolerant turtle, *Pseudemys scripta elegans*. *Peptides* 2001; 22: 873-878. (IF: 2,137)

Az eredmények 4. fejezetéhez felhasznált közlemények

21. Kiss P, Hauser D, Tamás A, Lubics A, Rácz B, Horváth Zs, Farkas J, Zimmermann F, Stepien A, Lengvári I, Reglődi D. Changes in open-field activity and novelty-seeking behavior in periadolescent rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox Res* 2007; 12: 85-93. (IF: 5,234)
22. Kiss P, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Hauser D, Horváth Zs, Rácz B, Gábel R, Babai N, Tóth G, Reglődi D. Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes and retinal degeneration. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 365-370. (IF: 1,93)
23. Kiss P, Tamás A, Lubics A, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I, Reglődi D. Development of neurological reflexes and motor coordination in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox Res* 2005; 8: 235-244. (IF: 1,664)
24. Lubics A, Reglődi D, Tamás A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic/ischemic injury. *Behav Brain Res* 2005; 157: 157-165. (IF: 2,865)
25. Hollósy T, Józsa R, Jakab B, Németh J, Lengvári I, Reglődi D. Effects of in ovo treatment with PACAP antagonist on general activity, motor and social behavior in chickens. *Regul Pept* 2004; 123: 99-106. (IF: 2,531)
26. Reglődi D, Kiss P, Tamás A, Lengvári I. The effects of PACAP and PACAP antagonist on the neurobehavioral development of newborn rats. *Behav Brain Res* 2003; 140: 131-139. (IF: 2,817)

Az eredmények 5. fejezetéhez felhasznált közlemények

27. Rácz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Róth E, Tóth G, Hegyi O, Verzár Zs, Fabricsek Cs, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the PKA-Bad-14-3-3 signaling pathway in glutamate-induced retinal injury in neonatal rats. *Neurotox Res* 2007; 12: 95-104. (IF: 5,234)
28. Rácz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tóth G, Hegyi O, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Róth E, Tamás A, Lengvári I, Lubics A, Reglődi D. The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involves inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul Pept* 2006; 137: 20-26. (IF: 2,442)
29. Rácz B, Tamás A, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Gallyas F Jr, Róth E, Reglődi D. Involvement of ERK and CREB signalling pathways in the protective effect of PACAP on monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 507-511. (IF: 1,93)
30. Reglődi D, Fábián Zs, Tamás A, Lubics A, Szeberényi J, Alexy T, Tóth K, Márton Zs, Borsiczky B, Róth E, Szalontay L, Lengvári I. Effects of PACAP on in vitro and in vivo neuronal cell death, platelet aggregation, and production of reactive oxygen radicals. *Regul Pept* 2004; 123: 51-59. (IF: 2,531)

Az eredmények 6. fejezetéhez felhasznált közlemények

31. Boronkai A, Brubel R, Rácz B, Tamás A, Kiss P, Horváth G, Lubics A, Szigeti A, Bellyei Sz, Tóth G, Lakatos A, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the survival and signal transduction pathways in human choriocarcinoma cells. *Ann NY Acad Sci* 2009; in press. (IF: 1,731)
32. Reglődi D, Börzsei R, Bagoly T, Boronkai A, Rácz B, Tamás A, Kiss P, Horváth G, Brubel R, Németh J, Tóth G, Helyes Zs. Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 270-278. (IF: 1,735)
33. Pirger Zs, Németh J, Hiripi L, Tóth G, Kiss P, Lubics A, Tamás A, Hernádi L, Kiss T, Reglődi D. PACAP has anti-apoptotic effect in the salivary gland of an invertebrate species, *Helix pomatia*. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 105-114. (IF: 1,735)
34. Szakály P, Kiss P, Lubics A, Magyarlaci T, Tamás A, Rácz B, Lengvári I, Tóth G, Reglődi D. Effects of PACAP on survival and renal morphology in rats subjected to renal ischemia-reperfusion. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 89-96. (IF: 1,735)
35. Rácz B, Gasz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Róth E, Reglődi D. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul Pept* 2008; 145: 105-115. (IF: 2,422)
36. Rácz B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Kiss P, Róth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglődi D. Protective effects of pituitary adenylate

- cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153: 115-123. (IF: 2,562)
37. Gasz B, Rácz B, Róth E, Borsiczky B, Tamás A, Boronkai Á, Gallyas F Jr, Tóth G, Reglődi D. PACAP inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 293-297. (IF: 1,93)
 38. Gasz B, Rácz B, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamás A, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F Jr, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 2006; 27: 87-94. (IF: 2,701)

Egyéb saját közlemények

1. Szabadfi K, Atlasz T, Horváth G, Kiss P, Hamza L, Farkas J, Tamás A, Lubics A, Gábel R, Reglődi D. Early postnatal enriched environment decreases retinal degeneration induced by monosodium glutamate treatment. *Brain Res* 2009 in press (IF: 2,218).
2. Farkas J, Reglődi D, Gaszner B, Szőgyi D, Horváth G, Lubics A, Tamás A, Falko F, Besirevic D, Kiss P. Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain Res Bull* 2009 in press. (IF: 1,943)
3. Kiss P, Szőgyi D, Reglődi D, Horváth G, Farkas J, Lubics A, Tamás A, Atlasz T, Szabadfi K, Babai N, Gábel R, Koppán M. Effects of perinatal asphyxia on the neurobehavioral and retinal development of newborn rats. *Brain Res* 2009 in press. (IF: 2,341)
4. Róth E, Weber G, Kiss P, Horváth G, Tóth G, Gasz B, Ferencz A, Gallyas F, Reglődi D, Rácz B. Effects of PACAP and preconditioning against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in vitro. *Ann NY Acad Sci* 2009 in press. (IF: 1,731)
5. Ferencz A, Rácz B, Tamás A, Reglődi D, Lubics A, Németh J, Nedvig K, Kalmár-Nagy K, Horváth OP, Weber G, Róth E. Influence of PACAP on oxidative stress and tissue injury following small bowel autotransplantation. *J Mol Neurosci* 2009; 37: 168-176. (IF: 1,735)
6. Sándor K, Bölcskei K, McDougall JJ, Schuelert N, Reglődi D, Elekes K, Pethő G, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs. Divergent peripheral effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 38 on nociception in rats and mice. *Pain* 2009; 141: 143-150. (IF: 5,249)
7. Somogyi I, Boros Á, Engelmann P, Németh J, Lubics A, Tamás A, Kiss P, Reglődi D, Pollák E, Molnár L. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like compounds could modulate the activity of coelomocytes in earthworm. *Ann NY Acad Sci* 2009 in press. (IF: 1,731)
8. Rácz B, Horváth G, Faluhelyi N, Nagy AD, Tamás A, Kiss P, Gallyas F, Tóth G, Gaszner B, Csernus V, Reglődi D. Effects of PACAP on the circadian changes of signaling pathways in chicken pinealocytes. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 220-226. (IF: 1,735)
9. Shioda S, Vaudry H, May V, Braas K, Reglődi D, Gozes I. In memory of our teacher, dr Akira Arimura. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 3-7.
10. Hernádi L, Pirger Zs, Kiss T, Németh J, Márk L, Kiss P, Tamás A, Lubics A, Tóth G, Shioda S, Reglődi D. The presence and distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) in the snail *Helix pomatia*. *Neuroscience* 2008; 155: 387-402. (IF: 3,352)
11. Várhalmi E, Somogyi I, Kiszler G, Németh J, Reglődi D, Lubics A, Kiss P, Tamás A, Pollák E, Molnár L. Expression of PACAP-like compounds during the caudal regeneration of the earthworm *Eisenia fetida*. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 166-174. (IF: 1,735)
12. Gaál V, Márk L, Kiss P, Kustos I, Tamás A, Kocsis B, Lubics A, Németh V, Németh A, Lujber L, Pytel J, Tóth G, Reglődi D. Investigation of the effects of PACAP on the composition of tear and endolymph proteins. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 321-329. (IF: 1,735)
13. Boros Á, Reglődi D, Herbert Zs, Kiszler G, Németh J, Lubics A, Kiss P, Tamás A, Shioda S, Matsuda K, Pollák E, Molnár L. Changes in the expression of PACAP-like compounds during the embryonic development of the earthworm *Eisenia fetida*. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 157-165. (IF: 1,735)
14. Kövesdi E, Tamás A, Reglődi D, Farkas O, Pál J, Tóth G, Bukovics P, Dóczy T, Büki A. Posttraumatic administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in central fluid percussion injury in rats. *Neurotox Res* 2008; 13: 71-78. (IF: 5,234)
15. Molnár L, Pollák E, Boros Á, Shioda S, Nakajo S, Tamás A, Lengvári I, Reglődi D, Lubics A. PAC1 receptor localization in a model nervous system: light and electron microscopic immunocytochemistry on the earthworm ventral nerve cord ganglia. *Regul Pept* 2008; 145: 96-104. (IF: 2,422)
16. Helyes Zs, Pozsgai G, Börzsei R, Németh J, Bagoly T, Márk L, Pintér E, Tóth G, Elekes K, Szolcsányi J, Reglődi D. Inhibitory effect of PACAP38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammation in the rat. *Peptides* 2007; 28: 1847-1855. (IF: 2,368)
17. Kiss P, Reglődi D, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Józsa R, Somogyvári-Vigh A, Szilvássy Z, Németh J. Changes of PACAP levels in the brain show gender differences following short-term water and food deprivation. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 152: 225-230. (IF: 2,562)

18. Kövesdi E, Czeitel E, Tamás A, Reglődi D, Szellár D, Pál J, Bukovics P, Dóczi T, Büki A. Rescuing neurons and glia: is inhibition of apoptosis useful? *Progr Br Res* 2007; 161: 81-95. (IF: 2,014)
19. Atlasz T, Babai N, Reglődi D, Kiss P, Tamás A, Bari F, Domoki F, Gábel R. Diazoxide is protective in the rat retina against ischemic injury induced by bilateral carotid occlusion and glutamate-induced degeneration. *Neurotox Res* 2007; 12: 105-111. (IF: 5,234)
20. Rác B, Reglődi D, Fodor B, Gasz B, Lubics A, Gallyas F Jr, Róth E, Borsiczky B. Hyperosmotic stress-induced apoptotic signaling pathways in chondrocytes. *Bone* 2007; 40: 1536-1543. (IF: 3,966)
21. Németh J, Jakab B, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Kiss P, Oberitter Zs, Horváth B, Szilvássy Z, Reglődi D. PACAP-27 radioimmunoassay: Description and application of a novel method. *J Radioanal Nucl Chem* 2007; 273: 327-332. (IF: 0,499)
22. Rác B, Reglődi D, Kiss P, Babai N, Atlasz T, Gábel R, Lubics A, Gallyas F Jr, Gasz B, Tóth G, Róth E, Hegyi O, Lengvári I, Tamás A. In vivo neuroprotection by PACAP in excitotoxic retinal injury: review of effects on retinal morphology and apoptotic signal transduction. *Int J Neuroprot Neurodeg* 2006; 2: 80-85.
23. Németh J, Reglődi D, Pozsgai G, Szabó Á, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs. Effect of PACAP-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience* 2006; 143: 223-230. (IF: 3,427)
24. Józsa R, Németh J, Tamás A, Hollósy T, Lubics A, Jakab B, Oláh A, Lengvári I, Arimura A, Reglődi D. Short-term fasting differentially alters PACAP and VIP levels in the brains of rats and chickens. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 354-358. (IF: 1,93)
25. Faluhelyi N, Reglődi D, Csernus V. The effects of PACAP and VIP on the in vitro melatonin secretion from the embryonic chicken pineal gland. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 271-275. (IF: 1,93)
26. Atlasz T, Kőszegi Zs, Babai N, Tamás A, Reglődi D, Kovács P, Hernádi I, Gábel R. Microiontophoretically applied PACAP blocks excitatory effects of kainic acid in vivo. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 143-148. (IF: 1,93)
27. Németh J, Tamás A, Józsa R, Horváth JE, Jakab B, Lengvári I, Arimura A, Lubics A, Reglődi D. Changes in PACAP levels in the central nervous system after ovariectomy and castration. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 468-473. (IF: 1,93)
28. Molnár L, Pollák E, Boros Á, Reglődi D, Tamás A, Lengvári I, Arimura A, Lubics A. Comparative anatomy of PACAP-immunoreactive structures in the ventral nerve cord ganglia of lumbricid *Oligochaetes*. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 427-430. (IF: 1,93)
29. Tamás A, Zsombok A, Farkas O, Reglődi D, Pál J, Büki A, Lengvári I, Povlishock JT, Dóczi T. Postinjury administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) attenuates traumatically induced axonal injury in rats. *J Neurotrauma* 2006; 23: 686-695. (IF: 3,453)
30. Józsa R, Hollósy T, Németh J, Tamás A, Lubics A, Jakab B, Oláh A, Arimura A, Reglődi D. Presence of PACAP and VIP in embryonic chicken brain. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 348-353. (IF: 1,93)
31. Faluhelyi N, Reglődi D, Csernus V. Development of the circadian melatonin rhythm and its responsiveness to PACAP in the embryonic chicken pineal gland. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1040: 305-309. (IF: 1,93)
32. Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide plays a role in olfactory memory formation in chicken. *Peptides* 2005; 26: 2344-2350. (IF: 2,231)
33. Faluhelyi N, Reglődi D, Lengvári I, Csernus V. Development of the circadian melatonin rhythm and the effect of PACAP on melatonin production in the embryonic chicken pineal gland. An in vitro study. *Regul Pept* 2004; 123: 23-28. (IF: 2,531)
34. Farkas O, Tamás A, Zsombok A, Reglődi D, Pál J, Büki A, Lengvári I, Povlishock JT, Dóczi T. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in a rat model of traumatic brain injury. *Regul Pept* 2004; 123: 69-75. (IF: 2,531)
35. Jakab B, Reglődi D, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Oroszi G, Szilvássy Z, Szolcsányi J, Németh J. Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J Biochem Biophys Meth* 2004; 61: 189-198. (IF: 1,302)
36. Csernus V, Józsa R, Reglődi D, Hollósy T, Somogyvári-Vigh A, Arimura A. The effect of PACAP on rhythmic melatonin release of avian pineals. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 135: 62-69. (IF: 1,751)
37. Lubics A, Reglődi D, Szélier M, Lengvári I, Kozicz T. Comparative distribution of urocortin- and CRF-like immunoreactivities in the nervous system of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Peptides* 2003; 24: 205-213. (IF: 2,44)
38. Lubics A, Reglődi D, Szélier M, Lengvári I. Time course of the regeneration of the earthworm cerebral ganglion with special reference to the serotonergic elements. *Eur J Anat* 2002; 6: 147-152.
39. Hegedüs M, Maros É, Reglődi D. Rapunzel-szindróma. A trichobezoar ritka formája. *Lege Artis Medicinae* 2002; 12: 248-249.
40. Somogyvári-Vigh A, Józsa R, Reglődi D, Hollósy T, Meggyesi R, Lengvári I, Arimura A. Influence of pinealectomy on levels of PACAP and cAMP in the chicken brain. *Regul Pept* 2002; 109: 9-13. (IF: 3,205)
41. Németh J, Jakab B, Reglődi D, Lubics A, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lengvári I, Görcs T, Szolcsányi J. Comparative distribution of VIP in the central nervous system of various species measured by a new radioimmunoassay. *Regul Pept* 2002; 109: 3-7. (IF: 3,205)

42. Józsa R, Somogyvári-Vigh A, Reglődi D, Hollósy T, Arimura A. Distribution and daily variations of PACAP in the chicken brain. *Peptides* 2001; 22: 1371-1377. (IF: 2,137)

Ph.D. fokozat megszerzése előtti közlemények

43. Reglődi D, Somogyvári-Vigh A, Vigh S, Maderdrut JL, Arimura A. Spontaneous postischemic hyperthermia and its effects in middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Neurol* 2000a; 163: 399-407. (IF: 3,858)
44. Reglődi D, Somogyvári-Vigh A, Vigh S, Kozicz T, Arimura A. Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 2000b; 31: 1411-1417. (IF: 6,008)
45. Reglődi D, Somogyvári-Vigh A, Vigh S, Maderdrut JL, Arimura A. Neuroprotective effects of PACAP38 in a rat model of transient focal ischemia under various experimental conditions. *Ann NY Acad Sci* 2000c; 921: 119-128. (IF: 1,381)
46. Somogyvári-Vigh A, Pan W, Reglődi D, Vigh S, Kastin AJ, Arimura A. The passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood-brain barrier during focal cerebral ischemia. *Regul Pept* 2000d; 91: 89-95. (IF: 2,634)
47. Somogyvári-Vigh A, Reglődi D, Li M, Lengvári I, Vigh S, Arimura A. Tissue distribution of PACAP27 and 38 in the *Oligochaeta*: PACAP27 is the dominant form in the nervous system of *Lumbricus polyphemus*. *Peptides* 2000; 21: 1185-1191. (IF: 1,867)
48. Reglődi D, Szelier M, Lengvári I, Vigh S, Arimura A. PACAP38-like immunoreactivity in the nervous system of *Oligochaeta*. *Peptides* 2000; 21: 183-188. (IF: 1,867)
49. Reglődi D, Lubics A, Szelier M, Lengvári I. Gastrin- and cholecystokinin-like immunoreactivities in the nervous system of the earthworm. *Peptides* 1999; 20: 569-577. (IF: 2,173)
50. Reglődi D, Lubics A, Szelier M, Balaspiri L, Lengvári I. Galanin-like immunoreactivity in the nervous system of *Oligochaeta*. *Eur J Anat* 1998; 2: 141-146.
51. Reglődi D, Lubics A, Szelier M, Lengvári I. Serotonin immunoreactivity in the peripheral nervous system of *Oligochaeta*. *Acta Biol Hung* 1997; 48: 439-451.
52. Lubics A, Reglődi D, Slezák S, Szelier M, Lengvári I. Colocalization of serotonin and FMRFamide-like immunoreactivities in the nervous system of the earthworm, *Eisenia fetida*. *Acta Histochem* 1997; 99: 459-467. (IF: 0,75)
53. Reglődi D, Lubics A, Slezák S, Szelier M, Lengvári I. Substance P immunoreactive elements in the nervous system of earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Acta Biol Hung* 1997; 48: 189-200.
54. Reglődi D, Slezák S, Lubics A, Szelier M, Elekes K, Lengvári I. Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of *Lumbricus terrestris*. *Cell Tissue Res* 1997; 288: 575-582. (IF: 1,74)

Köszönetnyilvánítás

Nagyon sok embernek tartozom köszönettel, akik munkámban elindítottak, végig támogattak, és segítettek létrehozni és fenntartani egy csapatot.

Legnagyobb köszönettel közvetlen munkacsoportunknak és kollaborációs munkatársaimnak tartozom, akikkel létrehoztunk egy fantasztikus csapatot, és ahol baráti szellemben élvezet a munka. Elsősorban volt Ph.D. hallgatóimnak, jelenlegi munkatársaimnak köszönöm az együtt végzett munkát: Tamás Andreának, aki rekordsebességgel védte meg Ph.D. értekezését, és erőt adott ahhoz, hogy elindítsuk itthon a neuroprotektív munkacsoportot; Kiss Péternek, aki a közelmúltban védte meg Ph.D. értekezését, és aki fáradhatatlanul tesztelte már hallgató korában is a kisállatokat; Rácz Boglárkának, aki kimeríthetetlen energiával méri a sejtek apoptózisát és jelátviteli útjait, és aki nélkül a molekuláris biológiai kísérletek nem valósulhatnak meg. A munkacsoport további tagjainak, Lubics Andreának a szövettani értékelésben végzett munkáját, és Horváth Gabriellának a molekuláris biológiai kísérletekben nyújtott segítségét köszönöm. Ezenkívül köszönettel tartozom a sok TDK hallgatónak, valamint a jelenlegi Ph.D. hallgatóknak, akik mindig lelkesedéssel és precízen végezve munkájukat, nagyban hozzájárultak a kísérletek sikeréhez: Farkas József, Horváth Gábor, Hauser Diána, Szőgyi Donát, Horváth Zsuzsanna, Frank Falko, Anita Stepien, Florian Zimmermann, Szalai Milán, Bánki Eszter, Csanaky Katalin, Gaál Valéria és Brubel Réka. Bár hivatalosan nem tartoznak munkacsoportunkhoz, mégis, az évek óta tartó nagyon szoros együttműködés és rengeteg segítség miatt a munkacsoport tagjainak tekinthetők a PTE TTK Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék munkatársai, Atlasz Tamás, Szabadfi Krisztina és Babai Norbert, akik nélkül a retinán végzett kutatások nem lettek volna lehetségesek, és akik lelkesedése és munkabírása nagyban hozzájárult a projektek sikeréhez. Vezetőjük Gábor Róbert, aki mindig is támogatta a közös munkát, és nagyban segítette szakértelmével a retinán végzett kísérleteket. Rábl Katalinnak és Vigh Józsefnek a teknős kísérletek elvégzésében nyújtott segítőért tartozom köszönettel. A csirke kísérletekben végzett munkában köszönöm Józsa Ritának és Hollósy Tibornak a sok segítséget.

Köszönöm az PTE ÁOK Anatómiai Intézet vezetőinek és munkatársainak, hogy munkámat mindig támogatták. Lengvári Istvánnak, aki gyakorlatvezetőként az anatómiát megszerettette velem, aki lehetőséget biztosított az intézetben folyó TDK munkára, és Ph.D. témavezetőként mindig támogatott. Köszönöm Sétáló György és Csernus Valér intézetvezetőknek a belém vetett hitet és támogatást. Külön köszönettel tartozom még Horváth Juditnak és Gaszner Baláznak a rengeteg önzetlen segítségért. Csernus Valérnak és munkatársainak, Faluhelyi Nándornak és Nagy Andrásnak külön köszönöm az együtt végzett kísérletes munkát. Köszönöm a kísérletes munkában nyújtott asszisztenciát Dittrich Erzsébetnek és Szelier Mártának.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani annak a sok-sok embernek, barátaimnak, akikkel kollaborációs kapcsolatot építettünk ki, és akik segítségével a szerteágazó témájú kutatások megvalósulhatnak:

PTE ÁOK-ról

Ifj. Gallyas Ferencnek, Boronkai Árpádnak és Sümegi Balázsnak a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetből a molekuláris biológia mérésekben nyújtott segítségükért és Márk Lászlónak, a tömegspektrometriai mérések szakértőjének.

Helyes Zsuzsannának és munkacsoportjának a Farmakológiai és Farmakoterápiás intézetből, akikkel a PACAP gyulladásban és fájdalomban játszott szerepét vizsgáljuk, valamint a PACAP humán mintákban való kimutatását.

Dóczi Tamásnak, Büki Andrásnak és munkatársainak az Idegsebészeti Klinikáról, a PACAP trauma modellben történő vizsgálatában nyújtott segítségért.

A Sebészeti Oktató és Kutatóintézetből Gasz Balázsnak és Ferencz Andreának a szív és bél szövetekben végzett kísérletekért, a Sebészeti Klinikáról Szakály Péternek, aki nélkül a vese kísérletek nem valósultak volna meg, valamint Szántó Zalának az agyi véráramlás mérésében nyújtott segítségéért.

Németh Józsefnek, a Debreceni Egyetem Farmakológiai intézetéből, akinek segítségével a PACAP különböző szövetekben való koncentrációjának mérése megvalósult.

Az MTA Balatoni Limnológiai Kutatóintézetből elsősorban Pirger Zsoltnak és Kiss Tibornak, a PACAP alacsonyabbrendű szervezetekben kifejtett hatásainak vizsgálatáért, valamint Hernádi Lászlónak és Elekes Károlynak a sok segítségért.

A PTE TTK Általános Állattani Tanszékéről Molnár László, Boros Ákos, Pollák Edit munkáját köszönöm, a PACAP alacsonyabbrendű szervezetekben való hatásának vizsgálatában.

A SZTE-ről Tóth Gábor professzornak, aki a PACAP-ot és fragmenseit szintetizálja, valamint Bari Ferenc professzornak és kutatócsoportjának, akivel a diazoxid neuroprotektív hatásait vizsgáltuk.

Köszönöm New Orleansi munkatársaimnak, Akira Arimura intézetvezető professzornak, aki a PACAP-ot felfedezte, igazán megszeretette velem ezt a témát, és hazatérésem után is sokat segített. Továbbá Somogyvári-Vigh Anikó, Vigh Sándor és Kozicz Tamás rengeteg segítséget nyújtott a neuroprotektív kutatómunka kezdetén.

Ha nem is közvetlenül a munkában nyújtott segítségért, de köszönettel tartozom tanítványaimnak a szeretetért, amivel akkor is erőt adnak a munkához, amikor a kísérletek nem mennek.

Végül, de nem utolsósorban, köszönöm családomnak, édesanyámnak, kislányomnak és férjemnek a támogatást és a türelmet, valamint nagyon sok barátomnak, akik segítettek.